

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

STUDIEN ZUR INTRAZELLULÄREN LOKALISATION EINES
EOSINOPHIL-CHEMOTAKTISCHEN FAKTORS (ECF) UND
SEINES INAKTIVATORS IN MENSCHLICHEN NEUTROPHILEN
GRANULOZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Norbert Frickhofen
aus Bonn

1980

Mainz 1979

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

STUDIEN ZUR INTRAZELLULÄREN LOKALISATION EINES
EOSINOPHIL-CHEMOTAKTISCHEN FAKTORS (ECF) UND
SEINES INAKTIVATORS IN MENSCHLICHEN NEUTROPHILEN
GRANULOZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Norbert Frickhofen
aus Bonn

Mainz 1979



Dekan:	Professor Dr. H. Leithoff
1. Gutachter:	Professor Dr. W. König
2. Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. G. Brunner
3. Gutachter:	Professor Dr. R. Zahn

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.1980

Meiner Frau Monika
gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552623_0080

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. KÖNIG danke ich für die Vergabe des Themas und die intensive Betreuung und Diskussionsbereitschaft während der Arbeit in seinem Labor.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei Frau Priv. Doz. Dr. B. M. CZARNETZKI, allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und nicht zuletzt den zahlreichen Blutspendern (über 25 Liter Blut!) für ihre Mithilfe bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
I. EINLEITUNG	2
1. Entzündungsverlauf	2
1.1 Gefäßreaktionen und Leukozytenemigration	2
1.2 Chemotaxis	3
1.3 Krankheitsspezifische Zellreaktionen	5
2. Der eosinophile Granulozyt	6
2.1 Morphologie, Biochemie, Physiologie	6
2.2 Eosinophilotaxis	9
3. Eosinophil-chemotaktischer Faktor (ECF) :	14
bekannte Daten	
3.1 Ionophore-Stimulierung und Phagozytose	14
3.2 Inaktivatoren in Serum und Zellen	17
3.3 Charakterisierung des ECF	19
3.4 Modulation der Aktivierung und Freisetzung von ECF	19
II. AUFGABENSTELLUNG	21
III. MATERIAL UND METHODEN	22
1. Material	22
1.1 Chemikalien und Chromatographiematerial	22
1.2 Puffer und andere Lösungen	24
2. Anreinigung neutrophiler Granulozyten	26
¹²⁵ J-Oberflächenmarkierung	30
3. ECF-Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten	30
3.1 Stimulierung mit Ionophore A 23187 und Zymosan	30
3.2 ECF-Freisetzung durch hypotone Lyse der Granulozyten	31
4. Isolierung subzellulärer Partikel	32
4.1 Homogenisierung	32
4.2 Auftrennung des Homogenates	33
4.2.1 Differentialzentrifugation	33
4.2.2 Dichtegradientenzentrifugation	34

	Seite
5. Analyse der Zellstimulierung und der subzellulären Fraktionierung	36
5.1 Chemotaxis	36
5.2 Biochemische Bestimmungen	42
5.3 Gelchromatographie	52
IV. ERGEBNISSE	54
1. Analyse der Granulozytenstimulierung	54
1.1 Ionophore und Phagozytose	54
1.2 Hypotone Lyse	59
2. Subfraktionierung der Granulozyten	65
2.1 Homogenisierung	65
2.2 Trennung subzellulärer Struktureinheiten	69
2.2.1 Differentialzentrifugation	69
2.2.2 Dichtegradientenzentrifugation	76
2.3 Gelchromatographie	86
2.4 Versuche zur Freisetzung von ECF und Inaktivator aus Zellfraktionen neutrophiler Granulozyten	90
V. DISKUSSION	97
1. Subzelluläre Lokalisation von ECF und Inaktivator	97
1.1 Funktionelle Beziehung zu anderen Neutrophilen-Bestandteilen und Vergleich mit ECF-A	97
1.2 Lokalisation durch Zellfraktionierung	101
2. Modell der ECF-Freisetzung und -Inaktivierung	107
3. Physiologische und klinische Bedeutung von ECF	110
VI. ZUSAMMENFASSUNG	117
VII. LITERATURVERZEICHNIS	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AgAk-Komplexe	Antigen-Antikörper-Komplex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECF	Eosinophil chemotaktischer Faktor
ECF-A	Eosinophil chemotaktischer Faktor der Anaphylaxie
ECF-I	ECF aus ionophorestimulierten Zellen
ECF-Lyse	ECF aus hypoton-lysierten Zellen
ECF-Zx	ECF aus Zx-stimulierten Zellen
HETE	12-L-hydroxy-5, 8, 10-eicosatetraenoic acid
HHT	12-L-hydroxy-5, 8, 10-heptadecatrienoic acid
HPF	high power field = Gesichtsfeld bei einer Vergrößerung von 12,5 x 40
HSA	Humanes Serumalbumin
LDH	Laktatdehydrogenase
LMB	Lymphozyten, Monozyten, Basophile
MBP	major basic protein
NIF	Neutrophile immobilisierender Faktor
PAF	Plättchen aggregierender Faktor
PMN	Polymorphnukleäre = Granulozyten
p-NP-Phosphatase	p-Nitrophenyl-Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRS-A	slow reacting substance of anaphylaxis
T(A)CM	Tris-(Albumin-)Calcium-Magnesium-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
Zx	Zymosan, beladen mit Komplement

I. EINLEITUNG

Gegenstand dieser Arbeit sind die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Schon zu Beginn systematischer, mikroskopischer Untersuchungen sind Leukozyten als selbständige Blutbestandteile den Erythrozyten gegenüber gestellt worden. R. Virchow kannte jedoch im Jahre 1858 nur die Differenzierung in "einkernige und mehrkernige farblose Blutkörperchen", deren Beziehung zu den "zum Verwechseln ähnlichen Eiterkörperchen" nicht geklärt war (133). Erst gegen Ende des 19. Jahrhunderts konnte E. Metschnikoff nachweisen, daß die "Phagozyten" neben den zur gleichen Zeit entdeckten "humoralen" Faktoren einen wesentlichen Teil der zellulären Immunantwort des Organismus darstellen (107). Seit dieser Zeit sind die einzelnen Untergruppen der Leukozyten genau beschrieben worden und man erkannte, daß die verschiedenen Zelltypen charakteristisch für bestimmte Entzündungsphasen und -reize sind.

1. Entzündungsverlauf

1.1 Gefäßreaktionen und Leukozytenemigration

Nach Einwirken eines Entzündungsreizes kommt es zu einer Zirkulationsstörung, die mit Strömungsverlangsamung bis zur Stase und anschließender Permeabilitätssteigerung der Venolen und Kapillaren einhergeht. Diese Reaktionen werden durch Mediatoren wie Histamin, Serotonin und im weiteren Verlauf auch durch Faktoren des Kinin-, Komplement-, Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems ausgelöst. Infolge der veränderten Strömungsverhältnisse und einer noch nicht völlig verstandenen "erhöhten Klebrigkeit" der Gefäßendothelien oder Leukozyten kommt es zu einer Randstellung und zum Hängenbleiben der Granulozyten, die dann zwischen den Endothelien und durch die Basal-

membran hindurch in das perivaskuläre Gewebe auswandern. Sobald sie dort angelangt sind, bewegen sie sich zielstrebig auf den geschädigten Bezirk zu. Hauptursache dieses Verhaltens ist ein Mechanismus, der seit den Untersuchungen von W. Pfeffer (1884) und T. Leber (1888) "Chemotaxis" genannt wird.

1.2 Chemotaxis

McCutcheon beschrieb Chemotaxis als "eine Reaktion, bei der die Richtung der Bewegung von Zellen oder Organismen durch Substanzen in ihrer Umgebung bestimmt wird. Wenn die Bewegungsrichtung nicht eindeutig auf die Substanz zu oder von ihr weg zielt, handelt es sich um nur unwesentliche oder gar keine Chemotaxis." Zu den Ursachen und Mechanismen der Leukotaxis bestehen heute folgende Hypothesen (50, 85, 114, 145, 153):

Am Entzündungsort werden lösliche Substanzen ("chemotaktische Faktoren = Zytotaxine") gebildet, die in das umliegende Gewebe diffundieren. Somit entsteht ein Konzentrationsgradient, dessen Reichweite und Wirkungsdauer von der physikochemischen Natur und der Inaktivierung der chemotaktischen Substanzen abhängen. Diesen Gradienten registrieren die Leukozyten, indem sie die Faktoren an Rezeptoren auf der Plasmamembran (Größenordnung: 2000 pro Zelle) binden; die geringen Konzentrationsunterschiede entlang der Zelloberfläche vermitteln dabei wahrscheinlich die nötige Richtungsinformation. Das Spektrum der Zielzellen hängt davon ab, ob sie die Rezeptoren besitzen, die die entsprechenden Zytotaxine binden können. Möglicherweise entscheidet aber auch das Konzentrationsverhältnis verschiedener Faktoren über den Zelltyp, der stimuliert wird (z.B. "binary peptid system" von Wissler u. a.).

Die Bindung des Materials führt zu einer Reihe von intrazellulären Vorgängen, deren Bedeutung für die Chemotaxis noch ungeklärt ist.

Eine entscheidende Rolle spielen möglicherweise Serin-Esterasen, unter denen man ein bereits in Ruhe aktives ("activated esterase") und ein erst durch den Kontakt mit chemotaktischen Faktoren aktiviertes Enzym ("activatable esterase") unterscheidet. Über Membranveränderungen kommt es zu einer Stimulation des Zellstoffwechsels, und die sonst ungerichtete Bewegung der Granulozyten ("random migration") wird richtungsorientiert ("directional migration"): Mikrotubuli als "Skelett" und Mikrofilamente als "Muskeln" ermöglichen die selektive Ausbildung sogenannter Lamellipodien, und die Zellen wandern im Zickzack auf den Ort höherer Konzentrationen der Zytotaxine zu (= "positive" Chemotaxis; die Wanderung bestimmter Bakterien und Pflanzenzellen in die Richtung der geringeren Konzentrationen wird als "negative" Chemotaxis bezeichnet). Während dieser Wanderung können sich die Zellen auch gegenseitig durch Sekretion zusätzlicher chemotaktischer oder inaktivierender Faktoren beeinflussen. Im Zentrum des Gradienten angelangt, registrieren sie nach allen Seiten zu wieder abfallende Konzentrationen des Faktors und verbleiben daher mit aktiviertem Stoffwechsel am Ort der Schädigung. Eine weitere Zellwanderung kann jedoch auch unabhängig vom Erreichen des Gradientenzentrums durch hohe Dosen an Zytotaxinen ("high dose inhibition") oder vorausgegangenem Kontakt bzw. Vorinkubation mit dem gleichen Faktor ("Deaktivierung") gehemmt werden. Beide Phänomene sind zur Zeit noch nicht eindeutig definiert und ursächlich werden mehrere Hypothesen diskutiert: Rezeptorsättigung, Erschöpfung des Bestandes der aktivierbaren Esterase oder Hemmung der Zellmotilität durch gesteigerte Adhäsivität der Plasmamembran o.ä.. Nicht kreuzreagierende Substanzen können in diesen Fällen die Migration oft wieder aktivieren. Damit ergibt sich die Möglichkeit, daß sich die Wirkung unterschiedlicher Faktoren an der gleichen Zelle ergänzt.

Chemotaktische Faktoren beeinflussen also nur die Ausrichtung von Zellbewegungen. Streng davon zu unterscheiden sind die rein "chemokinetischen" Faktoren wie z.B. die Prostaglandine $\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGE_2 . Sie modulieren nur die Geschwindigkeit der ungerichteten Wanderung, ohne ihre räumliche Orientierung zu ändern. In vitro sind Chemotaxis und Chemokinesis oft nur schwer voneinander zu trennen, zumal konzentrationsabhängig fließende Übergänge zwischen chemokinetischer, chemotaktischer und hemmender Wirkung bei einigen Substanzen vorkommen dürften (Beispiel: Histamin (28)).

Zur Zeit ist noch unklar, ob die geschilderten Mechanismen nur im Gewebe ihre Wirkung entfalten, oder ob sie auch für die Auswanderung der Leukozyten aus den Gefäßen und vielleicht sogar aus dem Knochenmark verantwortlich sind. Sicher ist aber, daß sie entscheidenden Einfluß auf die Zusammensetzung der Zellen am Entzündungsherd haben: Sie vermitteln das zelluläre Reaktionsmuster, das spezifisch auf den jeweiligen Stimulus abgestimmt ist.

1.3 Krankheitsspezifische Zellreaktionen

Schilling beschreibt das klassische Bild der Entzündung nach folgendem Schema:

- neutrophile Kampfphase,
- monozytäre Abwehr- und Überwindungsphase,
- eosinophil-lymphozytäre Heilungsphase.

Einige Krankheitsbilder führen jedoch zu einer Betonung bestimmter Phasen oder zur spezifischen Reaktion einer einzelnen Leukozytengruppe. So finden sich Neutrophile bevorzugt an Orten, an denen die Komplementaktivierung eine wesentliche Rolle spielt, wie z.B. bei bestimmten Glomerulonephritiden und anderen Immunkomplexkrankheiten. Mononukleäre Zellen dagegen (Monozyten, Histiozy-

ten, Lymphozyten) sind vor allem bei Reaktionen vom Spättyp (z. B. Tuberkulinreaktion) anzutreffen. Wenig weiß man über die spezifische Ansammlung von Eosinophilen in der Zirkulation und im Gewebe. Bekannt ist die systemische und lokale Eosinophilie bei allergischen Erkrankungen (Rhinitis allergica, Extrinsic Asthma, Kontaktekzem, Arzneimittelallergie) und bei Wurminfektionen aller Art. Die Zahl der Eosinophilen ist jedoch ebenfalls erhöht bei flüchtigen oder chronischen und tropischen Lungeninfiltraten (bis zu 80 - 90 % !), bei Tumoren (Ovarialtumor, Lymphogranulomatose und generell bei Metastasierung oder Tumornekrose), Blutkrankheiten (Eosinophilen-Leumämie ?) und beim sogenannten "Hypereosinophilen Syndrom". Weniger ausgeprägt ist die Eosinophilie bei bestimmten Kollagenosen (Periarteriitis nodosa, Dermatomyositis), Hautkrankheiten (Dermatitis herpetiformis, Bullöses Pemphigoid), Hormonstörungen (M. Addison, Hypopituitarismus) und Infektionskrankheiten (Mumps, Scharlach, Infektiöse Mononukleose). Neben diesen spezifischen Krankheitsbildern muß jedoch berücksichtigt werden, daß es vererbare, konstitutionelle Eosinophilien gibt und daß tageszeitliche Schwankungen vorkommen, die v. a. durch NNR-Hormone ausgelöst werden (11).

Das breite Spektrum der möglichen Krankheitsbilder verdeutlicht, daß Eosinophilie ein sehr unspezifischer diagnostischer Parameter ist, und es stellt sich die Frage, welche Rolle dieser Leukozyt im Verlauf der einzelnen Erkrankungen spielt.

2. Der eosinophile Granulozyt

2.1 Morphologie, Biochemie, Physiologie (29, 80, 81, 156)

Während die Funktion der mononukleären Zellen und neutrophilen Granulozyten schon relativ gut erforscht ist (siehe Diskussion), birgt der Eosinophile noch viele Rätsel, obwohl er allein wegen seiner be-

sonderen Morphologie Wissenschaftler schon immer fasziniert hat. So konnte Schwartz 1914 in einer Literaturübersicht bereits 2758 Referenzen zitieren (119)! Nach diesen Angaben berichtete T.W. Jones im Jahre 1846 vor der Royal Society in London zum ersten Mal von "Zellen mit groben Granula". Die erste detaillierte Beschreibung stammt jedoch von Paul Ehrlich, der aufgrund der besonderen Affinität der Granula zu sauren Farbstoffen im Jahre 1879 den Namen "eosinophiler Leukozyt" prägte (47).

Durch diese auffälligen, rot anfärbbaren Granula unterscheidet sich der Eosinophile am deutlichsten von anderen Granulozyten: Sie sind wesentlich größer als beim Neutrophilen und enthalten nach elektronenmikroskopischen Befunden ein kristalloides "Core" mit regelmäßiger Innenstruktur, das in eine unstrukturierte Matrix eingebettet ist (108).

Die Matrix enthält eine hoch aktive Peroxidase (die sich chemisch von der neutrophiler Granulozyten unterscheidet) sowie eine Reihe von sauren Hydrolasen wie z.B. β -Glucuronidase und β -Glycero-Phosphatase, jedoch kein Lysozym und keine alkalische Phosphatase (146). Dies charakterisiert die Granula als echte Lysosomen. Das Core dagegen besteht wahrscheinlich zum größten Teil aus einer Gruppe kationischer Proteine (IP: 10) mit einem hohen Gehalt an Arginin. Eine Hauptkomponente bildet das "major basic protein" (MBP), das beim Menschen ein Molekulargewicht von 9200 bzw. 21 000 besitzt (110). Man hoffte, mit diesem Protein die seit langem vermutete entzündungshemmende Eigenschaft der Eosinophilen nachweisen zu können. Dies wurde bis jetzt jedoch nicht bestätigt; aufgrund des stark basischen Charakters könnten jedoch noch unbekannte Reaktionen mit sauren Gewebestrukturen eine Rolle spielen. Möglicherweise ist das Core auch Ursprung der schon im Jahre 1853 beschriebenen Charcot-Leyden'schen Kristalle in Sekreten und Geweben von Patienten mit hoher Eosinophilie (51).

Während also die Funktion des MBP noch umstritten ist, haben sich in jüngster Zeit Hinweise ergeben, daß eosinophile Granulozyten doch in der Lage sind, Entzündungen zu beeinflussen: Nachgewiesen wurden eine Histaminase, eine Phospholipase, Arylsulphatasen und Faktoren, die auf den Mediatorenumsatz einwirken (siehe Diskussion). Ein Teil dieser Faktoren soll ebenfalls in den großen, spezifischen Granula gespeichert sein; die Arylsulphatase und eine saure Phosphatase wurden dagegen in kleineren Granula gefunden, die kein kristalloides Core enthalten (112). Die Funktion und Beziehung dieser Vesikel zu anderen vesikulären Zellstrukturen (89) ist noch nicht geklärt.

Die Granula der Eosinophilen unterscheiden sich also deutlich von denen neutrophiler Leukozyten; im Übrigen bestehen jedoch nur geringe Unterschiede zwischen beiden Zelllinien: Eosinophile besitzen einen zwei- seltener dreisegmentierten Kern ("Brillenkern") mit kaum nachweisbarem Nukleolus (als Endzellen synthetisieren sie nur wenig neues Protein), etwas mehr Mitochondrien und einen besser ausgebildeten Golgi-Apparat als Neutrophile (155). Im Gegensatz zu manchen Tierarten entstehen beim Menschen beide Zelltypen nur im Knochenmark. Obwohl meist eine gemeinsame Stammzelle für alle Granulozyten postuliert wird, weisen doch einige Befunde auf unterschiedliche Vorläuferzellen hin (68, Ref.). Nach einer Teilungs- und Reifungsperiode von insgesamt 6 - 12 Tagen emigrieren beide Zellen aus dem Knochenmark. Eosinophile verlassen das Blut etwas schneller (nach 4 - 5 Stunden) als Neutrophile (nach 6 - 7 Stunden) und zwar vor allem in Gewebe, die der Umwelt ausgesetzt sind (Haut und Schleimhäute). Dort sterben sie nach ungefähr 2 - 4 Tagen ab, eine Rezirkulation kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (29, 87). Im Verlauf von Entzündungsprozessen sind beträchtliche Verschiebungen im System Knochenmark-Blut-Gewebe möglich (8). Aufgrund von Tierversuchen schätzt man, daß auf jeden Eosinophilen im Blut eine Re-

serve von 300 jugendlichen und reifen Zellen im Knochenmark und 100 - 300 Eosinophilen im Gewebe entfällt (72).

Auch funktionell verhalten sich beide Granulozyten ähnlich: Eosinophile haben ähnlich wie Neutrophile die Fähigkeit zur aktiven Bewegung, Chemotaxis und (speziesabhängigen) Phagozytose inerter Partikel, antikörperbeladener Erythrozyten, AgAk-Komplexe, Pilze, Bakterien, Mycoplasmen, v. a. aber zur Schädigung von Parasiten und deren Vorstufen (29, Ref.). Phagozytose scheint jedoch nicht die Hauptaufgabe dieser Zellen zu sein. Dafür spricht das Fehlen der bakteriziden Substanz Lysozym und die Beobachtung, daß die Phagozytoserate sehr viel niedriger und selektiver ist als die neutrophiler Leukozyten. Paradoxerweise ist jedoch der Stoffwechsel und die H_2O_2 -Produktion Eosinophiler sowohl in Ruhe als auch bei Phagozytose höher als bei neutrophilen Leukozyten (2). Dieser höheren Stoffwechselaktivität entspricht jedoch nicht eine gesteigerte Fähigkeit zum Abtöten von Mikroorganismen. Chemische Unterschiede der Peroxidasen beider Zellen und die unterschiedliche Verwendung von Halogenen im Peroxidase - H_2O_2 - Halogen - System unterstreichen Differenzen im Abtötungsmechanismus der beiden Zelllinien (38).

Was aber veranlaßt nun die Ansammlung von Eosinophilen zu bestimmten Zeiten und im Rahmen bestimmter Erkrankungen?

2.2 Eosinophilotaxis (52, 59, 68, 79, 136)

Bis in die 60er Jahre wurden alle Versuche zur Chemotaxis eosinophiler Leukozyten in vivo durchgeführt. Dies hatte den Nachteil, daß die an den Reaktionen beteiligten Partner kaum zu kontrollieren waren.

Samter et al. demonstrierten 1949 als erste, daß sich unter der Anaphylaxie aus Lungengewebe ein Faktor isolieren ließ, der im ge-

sunden Tier zu einer Eosinophilie führte (117). Damit wurde zum ersten Mal eine direkte Beziehung zwischen allergischen Reaktionen und dem Auftreten von eosinophilen Granulozyten in der Zirkulation hergestellt.

Zuerst glaubte man, daß bestimmte Antigene allein die Reaktionen der Eosinophilen auslösen würden. Bald jedoch zeigte es sich, daß nicht das Antigen selbst, sondern erst der Antigen-Antikörper-Komplex der auslösende Faktor war (31, 101). Somit konzentrierte sich das Interesse auf den Antikörper und es gelang auch, mit aggregiertem γ -Globulin alleine Eosinophile am Ort der Injektion zu akkumulieren (32). Verwirrung brachte jedoch die Beschreibung von Eosinophilie bei Suppression des Immunsystems (30) und bei Agammaglobulinämie (73). Antikörper waren also nicht in jedem Fall erforderlich; eine bestimmte physikochemische Charakteristik des Antigens schien bereits ausreichend zu sein.

Aus heutiger Sicht kann man sich erklären, daß bei vielen dieser Experimente Spaltprodukte des Komplementsystems beteiligt waren, die entweder über den "klassischen" oder den "alternativen Weg" entstanden waren. Es war Boyden, dem es im Jahre 1962 gelang, einen brauchbaren in vitro-Assay zu entwickeln (17). Mit Hilfe dieser Technik wurde nachgewiesen, daß sowohl der aktivierte Komplex C $\overline{567}$ (95), als auch die niedermolekularen C3- und C5-Bruchstücke (134, 78) auf Leukozyten chemotaktisch wirken.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Ansammlung von Eosinophilen ohne offensichtliche Beteiligung von Antikörpern ist der Nachweis von eosinophilotaktischen Lymphokinen: So produzieren T-Lymphozyten von Tieren, die mit Parasiten infiziert worden waren, nach Übertragung auf gesunde Tiere Faktoren, die zu einer lokalen und systemischen Eosinophilie führen (9, 111). Außerdem wurde ein chemotaktischer Faktor beschrieben, der nur in Anwesenheit des Antigens wirkt, das für seine Freisetzung verantwortlich war (ECFp, 130)

und eine Substanz, die direkt chemokinetisch für Eosinophile ist (ESP, 62).

Die in vivo-Versuche hatten jedoch auch gezeigt, daß nicht alle AgAk-Komplexe zu einer Stimulation der Eosinophilen führten. Manche Experimente gelangen nur, wenn γ_1 bzw. IgE, nicht aber die komplementbindenden Antikörper γ_2 bzw. IgG und IgM beteiligt waren (154). Da außerdem eine Eosinophilie während parasitärer und allergischer Erkrankungen von einem erhöhten Reaginspiegel begleitet wird (43), lag es nahe, eine Verbindung zwischen beiden Ereignissen zu sehen.

Im Anschluß an die von Samter erhobenen Befunde (117) entdeckten Kay und Austen im Jahre 1971 den ersten, spezifisch eosinophilotaktischen Faktor. Dieser Faktor wird während der allergischen Reaktion aus der Lunge freigesetzt und wird daher "Eosinophil-Chemotaktischer Faktor der Anaphylaxie" (ECF-A) genannt (82, 83). Er fand sich außerdem präformiert in Nasenpolypen (74), in den Granula von Ratten-Mastzellen (139) und in leukämischen Basophilen (99). Die Freisetzung dieses Mastzellmediators wird ähnlich wie Histamin durch Faktoren moduliert, die das cAMP-System beeinflussen (141). Er ist chemotaktisch (nicht aber chemokinetisch!) vornehmlich für Eosinophile und deaktiviert die Zellen nach Vorinkubation. Wie andere chemotaktische Faktoren führt er ebenfalls zu einer allgemeinen Zellaktivierung, die sich z.B. in einer Stimulation des Pentosephosphat-Shunts äußert (82).

Der chemotaktische Faktor wurde aus Lungengewebe extrahiert und als niedermolekulares, saures Peptid charakterisiert. Die Aminosäureanalyse ergab zwei Tetrapeptide der Sequenz Ala-Gly-Ser-Glu und Val-Gly-Ser-Glu, deren Funktion mit Hilfe synthetischer Analoga näher definiert wurde (55, 56). Während der Extraktion stellte sich allerdings eine beträchtliche Heterogenität der chemotaktischen Aktivität heraus: Neben den sauren Peptiden im Molekulargewichtsbereich

um 500 (ECF-A) fand man einen Neutrophil-Chemotaktischen Faktor (NCF-A) im hochmolekularen Bereich und zwischen beiden mindestens drei chemotaktische Prinzipien ähnlicher Spezifität wie ECF-A mit einem Molekulargewicht von 1300 - 2500; außerdem beobachtete man noch chemotaktisches Material im Bereich zwischen ECF-A und Histamin (15, 52). Diese Daten haben die Frage aufgeworfen, ob sich die als ECF-A bezeichnete Aktivität wirklich ausschließlich durch die (jetzt auch synthetisierten) Tetrapeptide erklären läßt. Weitere Experimente müssen auch eine Abgrenzung von den weiter unten beschriebenen Faktoren der Lipidklasse bringen.

Große Ähnlichkeit mit diesen Mastzellmediatoren haben auch Faktoren, die aus menschlichen Lungentumoren und Körperflüssigkeiten der Tumorträger isoliert wurden (ein anaplastisches Bronchialcarcinom: "squamous lung cell carcinoma", daher ECF-SLC). Die niedermolekulare Fraktion des chemotaktischen Materials (ECF-SLC) hat außer einer etwa geringeren Azidität fast identische Eigenschaften wie ECF-A.

Außer den bis jetzt beschriebenen chemotaktischen Faktoren sind in den letzten Jahren einige weitere Substanzen entdeckt oder genauer charakterisiert worden: Lange bestand Uneinigkeit darüber, ob Histamin in die Reihe der Zytotoxine einzuordnen ist. Es scheint nun sicher zu sein, daß dies stark von den experimentellen Bedingungen abhängt (Chemotaxisfilter, Zielzellen u.a.). Bei adäquater Versuchsanordnung wirkt Histamin in einem Bereich von 10^{-7} bis 10^{-6} M bevorzugt chemotaktisch auf Eosinophile, während es sich in niedrigeren Konzentrationen chemokinetisch verhält und in höheren Konzentrationen die Zellwanderung hemmt (29). Wegen seiner schnellen Inaktivierung ist die in vivo-Bedeutung von Histamin noch umstritten, obwohl ein Abbauprodukt, die Imidazolessigsäure, ebenfalls chemotaktisch ist (131).

Eine Reihe von Serumenzymen führt ebenfalls zur Wanderung von Leukozyten: Kallikrein (76), Plasminogen-Proaktivator (75) und die C3-Konvertase des alternativen Weges der Komplementaktivierung (116) beeinflussen allerdings vorwiegend neutrophile Granulozyten. Im Gegensatz dazu aktivieren einige Abkömmlinge der Arachidonsäure wiederum in erster Linie Eosinophile: HETE (ein Lipoxxygenaseprodukt, in Thrombozyten) und mit etwas geringerer Aktivität HHT (ein Cyclooxygenaseprodukt, in Thrombozyten und anderen Geweben) wirken chemokinetisch, chemotaktisch und deaktivierend auf Eosinophile (57, 60). Auch die Hauptprodukte der Cyclooxygenase, die Thromboxane und Prostaglandine haben Einfluß auf die Zellbewegung, indem sie entweder selbst chemotaktisch sind oder aber die Antwort der Leukozyten auf andere Faktoren modulieren (13, 44).

Fraglich ist zur Zeit noch die chemische Natur der Lipid-Chemotaktischen Faktoren, die nach passiver Sensibilisierung in der Ratten-Peritonealhöhle durch Antigenstimulation generiert wurden; auch sie sind teils chemotaktisch, teils chemokinetisch - vor allem aber für neutrophile Granulozyten (132).

Zusammenfassend kann man also sagen, daß sowohl "humorale Faktoren" als auch "direkte Zellprodukte" die Wanderung eosinophiler Granulozyten beeinflussen (siehe Diskussion, Seite 112, Tabelle 5). Im Serum vorhandene Substanzen wirken entweder etwa gleichwertig auf eosinophile, neutrophile und mononukleäre Leukozyten (Komplementfaktoren) oder bevorzugt auf Neutrophile (Serumenzyme). Spezifische auf Eosinophile wirken nur die direkt von Zellen produzierten Mediatoren. Abgesehen von Bakterien und Tumoren, die fast jede Zellfunktion nachahmen können, fällt auf, daß man diese Zellen zwei Grundtypen der Immunreaktion zuordnen kann:

Histamin, ECF-A und verwandte Substanzen stammen aus Mastzellen bzw. aus Basophilen, d.h. Zellen, die über IgE im Rahmen der Reaktion vom Soforttyp stimuliert werden können (Typ I nach Coombs

und Gell). Die andere Gruppe umfaßt Substanzen (ESP, ECF_p u. a.), deren Freisetzung mit der Funktion von Lymphozyten in Verbindung gebracht wird (die zum Teil als T-Lymphozyten identifiziert werden konnten: Typ IV-Reaktion). Beides sind Formen der allergischen Reaktion im weitesten Sinn: Sensibilisierte Zellen (B- und T-Lymphozyten) produzieren bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Stimulus eine erhöhte Zahl von Faktoren (Antikörper, Lymphokine ...), die eine Neutralisierung des Reizes zum Ziel haben. Schon bei Arbeiten über die "slow reacting substance of anaphylaxis" (SRS-A) wurde jedoch deutlich, daß die Übergänge der Begriffe "allergische" und "normergische" Reaktion fließend sind. So wurde der typische Allergiemediator SRS-A nicht nur in typischen Allergiezellen (Mastzellen und Basophilen), sondern auch in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen (33).

In diesem Zusammenhang müssen die Arbeiten von Czarnetzki, König und Lichtenstein gesehen werden: Sie konnten 1976 nachweisen, daß ein Faktor ähnlicher Größe und Spezifität wie ECF-"A" ebenfalls von Neutrophilen gebildet wird ("ECF"), Zellen also, die bei jeder normalen Entzündung als erste Front der Abwehr mobilisiert werden.

3. Eosinophil-chemotaktischer Faktor (ECF): bekannte Daten

3.1 Ionophore - Stimulierung und Phagozytose

Periphere Leukozyten sezernieren bei Antigen- oder anti-IgE-Stimulation einen Faktor, der dem von Kay und Austen beschriebenen ECF-A ähnelt. Ursprung dieser Aktivität ist der basophile Granulozyt, da nur er über IgE stimulierbar ist (36). Eine Aktivierung des Basophilen ist aber auch durch Ionophore A 23187 möglich. Dabei fiel

auf, daß Ionophore zu einer wesentlich stärkeren ECF-Produktion peripherer Leukozyten führt als Antigen- oder anti-IgE-Stimulation. Diese zusätzliche Aktivität stammt nicht nur aus basophilen, sondern auch aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Aufgrund der Konzentrationsverhältnisse im peripheren Blut sind also v.a. die Neutrophilen verantwortlich für die ECF-Freisetzung nach Inkubation mit Ionophore A 23187. Da es sich hierbei nicht um eine allergische Reaktion handelt, wurde die Substanz "ECF" und nicht ECF-"A" genannt.

Um die in vivo-Bedeutung der ECF-Sekretion Neutrophiler abschätzen zu können, wurde die Phagozytose von Zymosanpartikeln als physiologischer Zellstimulus ausgetestet (92). Ebenso wie die Stimulierung durch Ionophore führt auch die Phagozytose zu einer dosisabhängigen ECF-Freisetzung ("ECF-Zx"), deren Maximum allerdings unter dem der Ionophorestimulierung liegt ("ECF-I").

Abbildung 1 zeigt die ECF-Kinetik: Die Sekretion erreicht in beiden Fällen nach 10 - 15 Minuten ein Maximum, worauf ein allmählicher Aktivitätsabfall erfolgt; er ist unter den beschriebenen Bedingungen während der Phagozytose meist deutlicher ausgeprägt als mit Ionophore und variiert deutlich von Spender zu Spender. Auch die verschiedenen Umstände der Phagozytose bestimmen das Freisetzungsmuster: "Opsonisiertes", d.h. mit Komplementbruchstücken beladenes Zymosan (Zx) ist der wirksamste Stimulus. Unbehandeltes Zymosan dagegen ergibt zwar ähnliche Maximalwerte, die aber erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht werden. Die Gegenwart von Serum schließlich führt zu deutlich niedrigeren Maximalwerten.

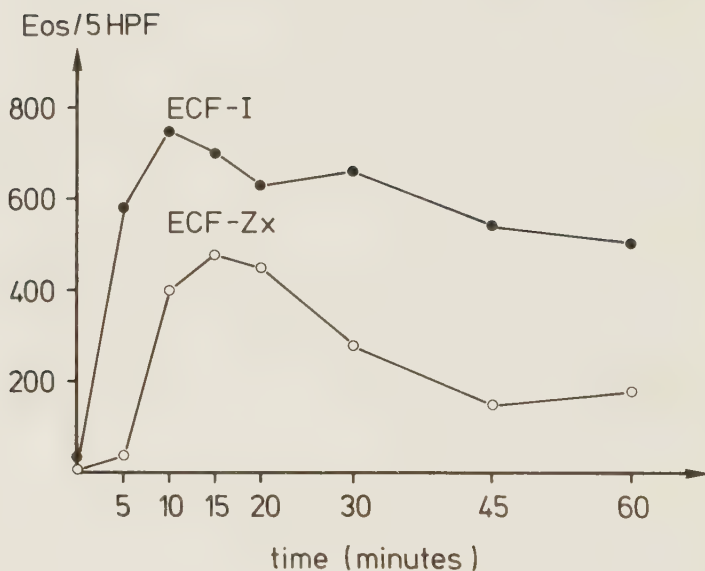


Abb. 1 :

Freisetzung eines Eosinophil-Chemotaktischen Faktors durch Stimulation neutrophiler Granulozyten mit Ionophore A 23187 (ECF-I) und während der Phagozytose von Zymosan (ECF-Zx). Da die Höhe des Maximums und der Grad des Aktivitätsabfalls individuell deutlich variierte, ist in dieser Abbildung nur das am häufigsten anzutreffende Muster wiedergegeben.

3.2 Inaktivatoren in Serum und Zellen

Die letzte Beobachtung wird gestützt durch den Nachweis einer heterogenen Klasse von Serumfaktoren, die freigesetzten ECF (durch Bindung oder enzymatisch?) inaktivieren können (91).

Neben diesen Seruminaktivatoren enthalten auch Granulozyten und mononukleäre Zellen selbst Faktoren, die zu einer Inaktivierung von ECF führen. Einen Hinweis darauf gibt schon die ECF-Kinetik: Der Aktivitätsabfall zu späteren Zeitpunkten läßt sich nicht durch eine Instabilität des chemotaktischen Faktors erklären, da eine Inkubation aktiver Zellüberstände in der Abwesenheit von Zellen nicht zu einer Aktivitätsabnahme führt (37).

Als mögliche Erklärung bietet sich eine Inaktivierung des ECF durch Zellprodukte an, die in späteren Phasen der Sekretion wirksam sind. Dies wird gestützt durch die Beobachtung, daß die Aktivität von Zellsonikat und aktivem Überstand im Gemisch geringer ist als die Summe der Aktivitäten in Zellsonikat und Überstand allein (93). In der Tat ergibt die Inkubation von Sonikaten unstimulierter neutrophiler (und auch mononukleärer) Leukozyten mit ECF bekannter Aktivität eine deutliche, dosisabhängige Inaktivierung (Abb. 2). Einen ähnlichen, jedoch schwächeren Effekt zeigen Überstände aus den späteren Phasen der Zellaktivierung, aus denen durch Dialyse kleinmolekulare Substanzen, und damit auch ECF, entfernt wurden.

Die Inaktivierung bezieht sich nur auf den chemotaktischen Faktor selbst und nicht auf die Eosinophilen. Sie ist insofern spezifisch, als nur ECF und ECF-A, nicht jedoch C5a und E.coli-Faktor (= "bacterial factor") ihre jeweilige chemotaktische Aktivität verlieren.

Das aktive Prinzip erwies sich als hochmolekular und hitzestabil. Über den Mechanismus der Inaktivierung herrscht jedoch noch Unklarheit: Die Schnelligkeit (innerhalb weniger Minuten), weitgehende Temperaturunabhängigkeit und die für ein Enzym uncharakteristische Kinetik sprechen eher für eine Inaktivierung durch Bindung als durch enzymatische Spaltung (37).

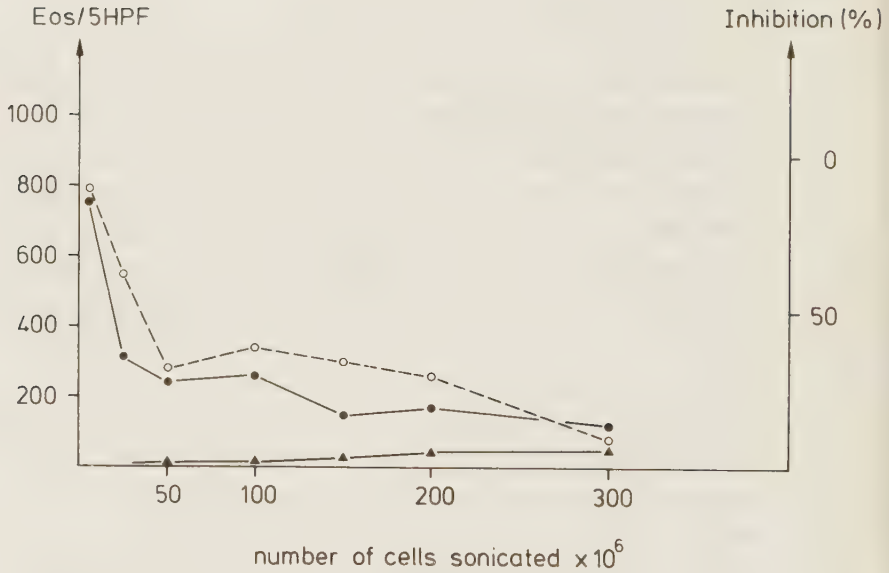


Abb. 2 :

Inaktivierung von ECF aus dem Überstand Ionophore- (o --- o) und Zx-stimulierter Granulozyten (● — ●) durch Inkubation mit Sonikaten unstimulierter Neutrophiler. Jeweils 300 μ l einer ECF-Lösung (Aktivität : 750 - 800 Eos / 5 HPF) wurden mit der angegebenen Zahl sonicierter Zellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml inkubiert (30 Minuten, 37°C). Nach hochtouriger Abzentrifugation wurden je 800 μ l des Überstandes ausgetestet. Eigenaktivität der Zellsonikate : ▲ — ▲

3.3 Charakterisierung des ECF

Eine Analyse des Eosinophil-chemotaktischen Faktors (ECF) aus Neutrophilen ergab große Ähnlichkeit mit dem von Kay und Austen beschriebenen ECF-A (56, 82): ECF ist kleinmolekular (< 1000), deaktiviert die Zellen nach Vorinkubation und ist ähnlich spezifisch in seiner chemotaktischen Wirkung auf eosinophile Leukozyten wie ECF-A. Selbst bei einer Ausgangspopulation von nur 2% Eosinophilen sind von den Zellen, die den Filter durchwandern, mehr als 50% eosinophile Granulozyten (35, 92).

ECF unterscheidet sich jedoch dadurch deutlich von ECF-A, daß Sonikate unstimulierter Zellen kaum ECF enthalten, während ECF-A in den Granula von Mastzellen vollständig präformiert vorliegt (139). Für diese Beobachtung bieten sich folgende Erklärungen an:

- a) ECF liegt intrazellulär nicht in seiner biologisch aktiven Form vor, sondern wird erst nach Stimulierung entweder "de novo" synthetisiert oder aus einem Vorläufermolekül ("Pro-ECF") aktiviert, und/oder
- b) ECF wird zwar biologisch aktiv gespeichert, seine Aktivität wird jedoch durch Inaktivatoren im Zellsonikat maskiert.

3.4 Modulation der Aktivierung und Freisetzung von ECF

Um diese Alternativen genauer zu analysieren, wurde die ECF-Generierung in den Zellen und die Freisetzung des Faktors in den Überstand untersucht. Dosis-Wirkungs-Experimente hatten gezeigt, daß vor allem bei suboptimaler Stimulation die ECF-Freisetzung erst nach einer dosisabhängigen Latenz einsetzte (bis zu 30 Minuten!). Dabei konnte ECF meist gleichzeitig in den Zellen und im Überstand nachgewiesen werden. DNA- und Proteinsynthesehemmer zeigten keinen Einfluß auf die Produktion oder die Freisetzung des

Faktors. Nach Inkubation der Neutrophilen mit 2-Desoxyglukose (Stoffwechselblocker) und Colchizin (Hemmstoff der Aggregation von Mikrotubuli) wurde dagegen signifikant weniger ECF freigesetzt. Colchizin schien dabei vorwiegend den intrazellulären Aktivierungsprozeß und Deoxyglukose vor allem die Freisetzung von ECF zu hemmen (93).

Diese Daten verdeutlichen, daß der von Granulozyten freigesetzte ECF im Unterschied zu ECF-A und Histamin nach der zur Zeit gängigen Definition nicht als präformierter Faktor bezeichnet werden kann. Im Hinblick auf seine Freisetzung ähnelt er mehr den Substanzen, die erst nach Stimulation der Zellen produziert werden; zu diesen gehören z.B. SRS-A, PAF und die Lipid-chemotaktischen Faktoren (98).

II. AUFGABENSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die subzellulären Strukturen der neutrophilen Granulozyten zu identifizieren, die für die Produktion bzw. Speicherung von ECF und Inaktivator verantwortlich sind. Da beide Faktoren noch nicht gereinigt vorliegen, war eine Lokalisation durch fluoreszenz-immunologische Methoden nicht möglich. Zur Lösung boten sich daher zwei Versuchskonzepte an:

1. Das Muster der ECF-Freisetzung sollte mit dem der Freisetzung von Zellenzym während der Zellaktivierung verglichen werden. Eine Übereinstimmung dieser kinetischen Daten wäre ein Hinweis auf gleiche Lokalisation oder zumindestens funktionelle Kopplung.
2. Die Zelle sollte "in ihre Einzelteile zerlegt werden" (subzelluläre Fraktionierung), die unterschiedlichen Zellstrukturen dann charakterisiert und auf ihre Wirkung in der Eosinophilen-Chemotaxis hin untersucht werden.

Von diesen Experimenten erhofften wir uns einen Beitrag zum besseren Verständnis der ECF-Freisetzung und -Inaktivierung durch neutrophile Granulozyten.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Chemikalien und Chromatographiematerial

Casein	Merck, Darmstadt
Chloroform	" "
Deoxycholsäure	" "
Glukose	" "
Glykogen	" "
Harris' Hämatoxylinlösung	" "
H ₂ O ₂	" "
Methanol	" "
Natriumdodecylsulfat	" "
Phenol-Reagenz	" "
Toluidinblau	" "
Vitamin B ₁₂	" "
Wright's Eosin-Methylenblau-Lösung	" "
Adenosin-5-Monophosphat	Sigma, München
Adenosin-5-Triphosphat	" "
DNA (Kälberthymus), Typ 1	" "
D-Glukose-6-Phosphat	" "
β-Glycerophosphat	" "
Hämoglobin (Rind)	" "
Heparin, Grad II	" "
2-(p-Iodophenyl)-3-(p-Nitrophenyl)- 5-Phenyltetrazoliumchlorid (INT)	" "
Lysozym	" "
Maltotriose	" "
Micrococcus lysodeicticus	" "
β-Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert	" "

p-Nitrophenol	Sigma, München
Peroxidase (Meerrettich), Typ II	" "
Phenolphthalein	" "
Phenolphthaleinglucuronid	" "
Pyruvat	" "
Stachyose	" "
Succinat	" "
Thymin-5-Monophospho-p-Nitrophenylester	" "
Zymosan A	" "
Dextranblau 2000	Pharmacia, Uppsala Schweden
Ficoll 400	" "
Sephadex G 10	" "
Sephadex G 25	" "
Sephadex G 200	" "
Äthylendiamintetraessigsäure	Serva, Heidelberg
Äthylenglycol-bis-(β -aminoäthyläther)- N,N'-tetraessigsäure	" "
Nonidet P 40	" "
o-Toluidin	" "
Triton X-100	" "
Äthylacetat	Riedel de Haen, Hannover
Chromotrop 2R	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Unter- türkheim
Dextran = Macrodex 6 %	Knoll, Ludwigshafen
¹⁴ C-Histamin	Amersham Buchler, Braunschweig
Humanes Serumalbumin (HSA)	Behringwerke, Marburg
Natriummetrizoat 75 %	Nyegaard & Co., Oslo Norwegen

p-Nitrophenylphosphat
Sterile Glukose 5 %

Boehringer, Mannheim
Fresenius, Bad Homburg

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

1.2 Puffer und andere Lösungen

pH und Leitfähigkeit (mS) der in dieser Arbeit erwähnten Lösungen wurden mit einem Knick-pH-Meter (Typ 26) und einem Leitfähigkeitsmesser der Firma Radiometer, Kopenhagen (Typ CDM 2e) eingestellt. Osmolaritätswerte (mOsmol/l) wurden aus den bekannten Konzentrationen der beteiligten Chemikalien unter der Annahme einer vollständigen Dissoziation der starken Säuren und Salze errechnet.

a) Tris-, TCM-, TACM-Puffer

Wenn nicht anders beschrieben, wurden physiologische Puffer folgender Zusammensetzung verwendet :

Tris (25 mM)	}	"Tris"	}	"TCM"	}	"TACM"
NaCl (120 mM)						
KCl (4 mM)						
CaCl ₂ (0,6 mM)						
MgCl ₂ (1 mM)						
Humanes Serumalbumin (HSA) (0,3 mg/ml)						

Der pH läßt sich mit HCl auf einen Wert von 7,4 einstellen.

b) Enzym-Assay-Puffer

Die in Tabelle 1 (siehe Seite 45) aufgeführten Puffer sind in 10-facher Konzentration angesetzt mehrere Wochen lang im Kühlschrank haltbar. Der pH dieser Stammlösungen wurde so eingestellt, daß er im kompletten Inkubationsansatz dem angegebenen Wert entsprach.

c) EDTA- und EGTA-Stammlösungen (0,1 M)

EDTA und EGTA lassen sich durch kurzes Erhitzen in Aqua dest. lösen und können dann mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt werden.

d) Lösungen zur Zellfärbung und Vitalitätsbestimmung

Die Zelldifferenzierung erfolgte nach Färbung von Trockenpräparaten nach der Methode von Wright: Übersichten des luftfixierten Ausstrichs mit Wright's Farbstofflösung (0,2 g% in Methanol); nach 1-2 Minuten Zugabe der gleichen Mengen eines Phosphatpuffers (2,5 mM, pH 6,5); anschließend gründliches Abspülen mit Wasser.

Eine schnellere Beurteilung ist durch Färbung eines Naßpräparates mit dem gleichen Volumen einer Toluidinblaulösung (50 mg Toluidinblau + 900 mg NaCl + 22 ml Äthanol (96 %ig) + Aqua dest. ad 100 ml) möglich.

Chemotaxisfilter müssen sofort nach Entnahme aus der Boyden-Kammer gefärbt werden:

- 2 Minuten in Harris' Hämatoxylinlösung
- Spülen mit Wasser
- kurzes Eintauchen in Isopropanol (70% + einige Tropfen HCl)
- Spülen mit Wasser
- 10 Minuten in Chromotrop 2R (0,5 % in Aqua dest., 30 Minuten bei 60°C gelöst und dann filtriert)
- Spülen mit Wasser und Trocknen im Trockenschrank

Die Vitalität der isolierten Zellen wurde mit dem Trypanblau-Ausschlußtest beurteilt: 5 Minuten nach Mischen von gleichen Teilen der Zellsuspension und einer Trypanblaulösung (0,5 % in physiologischer NaCl-Lösung) sind nur vitale Zellen noch nicht gefärbt; deren Prozentsatz kann daher durch einfaches Zählen gefärbter und ungefärbter Zellen bestimmt werden.

2. Anreinigung neutrophiler Granulozyten

Die von Böyum beschriebene Methode (18) besteht aus zwei Teilschritten (Abb. 3):

1. Abtrennung der Erythrozyten und Granulozyten von mononukleären Zellen;
2. Trennung von Granulozyten und Erythrozyten.

Heparinisiertes Blut (10 U Heparin/ml) freiwilliger, gesunder Spender wird mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 2:1 verdünnt. Bei stärkerer Verdünnung (Böyum 1:3!) war zwar die Trennung zwischen Granulozyten und Mononukleären vollständiger, aber das zu verarbeitende Volumen und damit der Zeitaufwand war in diesem Fall unverhältnismäßig groß, da pro Experiment in der Regel etwa 400 - 1000 ml Blut verarbeitet wurden.

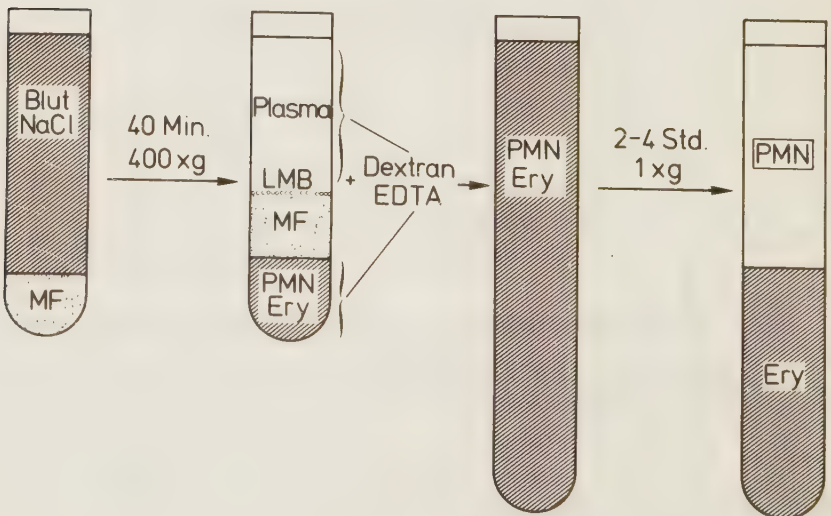


Abb. 3 :

Schema der Leukozytentrennung nach Böyum;
ausführliche Beschreibung im Text.

Zu 1: Zur Leukozytentrennung füllt man 10 ml einer Metrizoat-Ficoll-Lösung (MF) in transparente Kunststoff-Zentrifugenröhrchen (24 Teile Ficoll, 9% in H_2O + 10 Teile Natriummétrizoat, 33,9% in H_2O ; Dichte $1,077 \text{ g/cm}^3$). Auf die Oberfläche dieser Trennflüssigkeit werden mit Hilfe einer 50 ml-Spritze mit Dreiweghahn und Schlauch 30 - 40 ml des verdünnten Blutes aufgelegt, so daß sich eine scharfe Phasengrenze bildet. Während der anschließenden Zentrifugation (40 Minuten, 400 g, Raumtemperatur) sedimentieren die aggregierten Erythrozyten zusammen mit den Granulozyten durch das MF-Kissen hindurch. Das Lymphozyten-, Monozyten- und Basophilen-Gemisch (LMB) verbleibt aufgrund seiner geringeren Dichte als Ring auf der Oberfläche der Trennflüssigkeit. Das aufliegende Plasma schließlich enthält einen großen Teil der Thrombozyten. Nach der Zentrifugation werden vorsichtig zuerst das Plasma und getrennt davon der LMB-Ring abpipettiert; den Rest der MF-Lösung entfernt man bis auf 1-2 mm oberhalb der Erythrozyten-Granulozyten-Säule.

Zu 2: In dem nun folgenden zweiten Schritt werden die Granulozyten durch 1 g-Dextransedimentation von den Erythrozyten getrennt. Dazu resuspendiert man die Erythrozyten und Granulozyten in dem Plasma, das im ersten Zentrifugationsschritt gewonnen wurde. Etwa 5 Teile dieser Suspension werden mit 1 Teil einer Dextran-EDTA-Lösung (13 Teile Dextran, 6% + 5 Teile EDTA, 0,1 M) gemischt und in transparenten Kunststoffröhrchen bei Raumtemperatur stehen gelassen. Sobald sich nach 2 - 4 Stunden eine scharfe Grenze zwischen den sedimentierten Erythrozyten und dem Plasma gebildet hat, kann man vorsichtig das granulozytenreiche Plasma entfernen. Nach Abzentrifugation der Zellen werden die restlichen Erythrozyten durch hypotone NaCl-Lyse zerstört: Man resuspendiert das Sediment in 0,2% NaCl und isotonisiert die Lösung nach 20 - 30 Sekunden mit dem gleichen Volumen einer hypertonen NaCl-Lösung (1,6%). An-

schließlich müssen die Zellen mehrmals in Trispuffer bei 100 g gewaschen werden, um Erythrozytenmembranen und Thrombozyten zu entfernen.

Mit der angegebenen Methode erhält man eine Leukozytensuspension folgender Zusammensetzung (Mittelwerte aus 28 Zelltrennungen):

93,0 $\pm$ 1,7 % Neutrophile

4,4 $\pm$ 2,1 % Eosinophile

1,2 $\pm$ 0,7 % Mononukleäre, v. a. Lymphozyten.

Die übrigen Zellen sind Erythrozyten und sehr selten einmal basophile Granulozyten (Abb. 4).

Da neutrophile Granulozyten den größten Teil der Zellen stellen, werden in dieser Arbeit vereinfachend die folgenden Ausdrücke synonym gebraucht:

Neutrophile (Granulozyten) = Granulozyten = Polymorphnukleäre (PMN)

Von den gesamten Neutrophilen des Startmaterials lassen sich etwa 30 - 60 % ($390 \pm 170 \times 10^6$ Zellen/200 ml Blut) mit einer Vitalität von über 95% anreinigen.

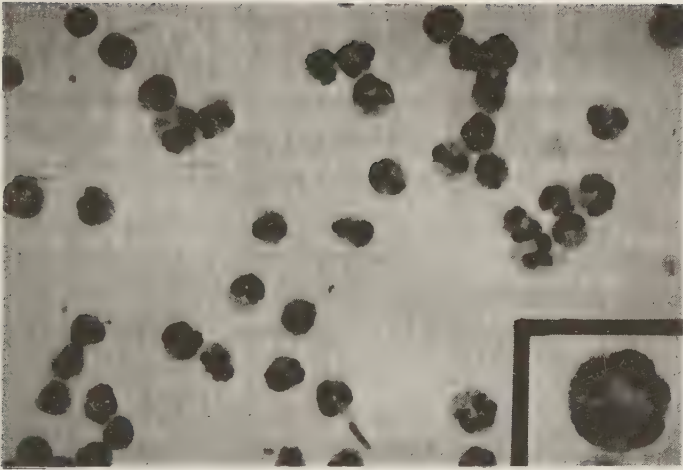


Abb. 4 : Menschliche neutrophile Granulozyten
 (oben links ein Lymphozyt), angereinigt
 nach der Methode von Böyum.

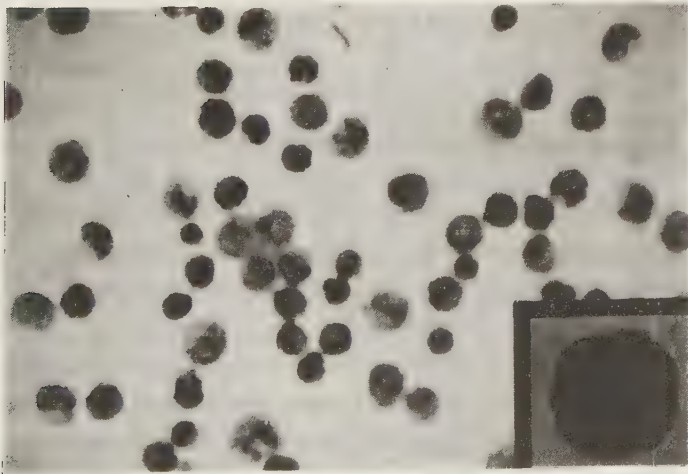


Abb. 5 : Meerschweinchen-Eosinophile, isoliert
 nach i.p.-Injektion von menschlichem
 Serum; Reinheitsgrad: etwa 47 %.

^{125}J -Oberflächenmarkierung

In einem Teil der Experimente wurden die PMN mit Hilfe der ^{125}J -Jod-Laktoperoxidase-Methode markiert (94):

Dazu wird 1 ml der Granulozytensuspension (5×10^7 PMN/ml TCM) mit 1 ml einer Radiojod-haltigen Markierungslösung ($100 \mu\text{Ci Na}^{125}\text{J} + 10 \mu\text{M KJ} + 0,5 \mu\text{M Laktoperoxidase/ml TCM}$) gemischt. Über einen Zeitraum von 12 Minuten werden dann in Abständen von 30 Sekunden je 10 μl einer H_2O_2 -Lösung (2,3 mM in TCM) unter ständigem Schütteln zugegeben. Nach weiteren 5 Minuten stoppt man die Reaktion mit 0,5 ml einer konzentrierten KJ-Lösung (0,1 M). Zum Entfernen der ungebundenen Radioaktivität müssen die Zellen anschließend mehrfach in Tris-EDTA-Puffer (EDTA 0,001 M) gewaschen werden. Die Aktivität der markierten Zellfraktionen wurde in einem "Auto-Gamma Scintillation Spectrometer 5260" der Firma Packard gemessen.

3. ECF-Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten

3.1 Stimulierung mit Ionophore A 23187 und Zymosan

Ionophore A 23187 (bezogen von Dr. R. Hamill, Eli Lilly Research Laboratories, Indianapolis, Indiana, USA) wurde in Äthanol gelöst (Stammlösung: 1×10^{-3} M) und zur Zellstimulierung in physiologischem Puffer verdünnt.

Zymosan muß zur Optimierung der Phagozytose mit Komplement "opsonisiert" werden: Dazu wird eine eingewogene Menge Zymosan (50 mg) kurz in Aqua dest. aufgekocht und dann nach zweimaligem Waschen in frischem menschlichen Serum (3-5 ml) inkubiert (20 Minuten / 37°C); nicht gebundene Serumbestandteile entfernt man durch mehrmaliges Waschen in Trispuffer. Diese komplementbeladenen Zymosanpartikel werden im folgenden mit "Zx" bezeichnet.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Granulozyten (1×10^7 /ml TACM) mit Ionophore (2-5 μ M) 12 Minuten und mit Zx (2-3 mg/ml) 15 Minuten lang bei 37°C stimuliert. Danach wurden sie sofort bei 4°C abzentrifugiert und nach mehrmaligem Waschen in Trispuffer ohne Ca^{++} und Mg^{++} Tris, wie weiter unten beschrieben, weiter verarbeitet.

Der Überstand der stimulierten Zellen läßt sich ohne wesentlichen Aktivitätsverlust im Eisschrank aufbewahren, um dann später auf enzymatische und chemotaktische Aktivität (ECF-I, ECF-Zx) hin untersucht zu werden.

3.2 ECF-Freisetzung durch hypotone Lyse der Granulozyten

Gereinigte Granulozyten (2×10^7 pro Ansatz) wurden wie üblich abzentrifugiert, der Überstand sorgfältig dekantiert und das Sediment kurz aufgeschüttelt und im Eisbad aufbewahrt.

Zur ECF-Freisetzung resuspendiert man nun diese Zellen in 1 ml eines schwachen Tris-HCl-Puffers (0,005 oder 0,01 M, pH 7,4, Leitfähigkeit: 0,4 bzw. 0,7 mS, Osmolarität: ~9 bzw. 18 mOsmol/l). Nach Inkubation im Wasserbad (37°C) über die angegebenen Zeiten werden durch Zugabe von 1 ml eines eiskalten, doppelt konzentrierten TCM-Puffers (Leitfähigkeit: 28 mS, Osmolarität: ~600 mOsmol/l) physiologische Bedingungen wieder hergestellt. Die lysierten Leukozyten müssen sofort bei 4°C abzentrifugiert werden (400 g, 5 Minuten), und enzymatische und chemotaktische Aktivität von Sediment und Überstand können dann getrennt ausgetestet werden.

4. Isolierung subzellulärer Partikel

4.1 Homogenisierung

Zur Auftrennung der Granulozyten in ihre verschiedenen Organellen wurden die Zellen in physiologischem Trispuffer ohne Ca^{++} und Mg^{++} und direkt vor der Homogenisierung einmal in Tris-HCl-gepufferter Saccharoselösung (0,34 M) gewaschen. Die Zellkonzentration in den jeweiligen Homogenisierungsmedien wurde so eingestellt, daß die Endkonzentration im Homogenat 5×10^7 Zellen/ml betrug.

Methoden

Wir testeten 3 verschiedene Homogenisierungsmethoden:

- a) Akustische Homogenisierung ("Sonication") mit einem Ultraschall-Homogenisator der Firma Mullard Equipment Ltd., England (Typ Nr. 7685/2); die Zellen wurden abhängig vom Volumen der Suspension mehrmals im Eisbad beschallt (10 - 20 Sekunden).
- b) Stickstoff-Cavitation ("Nitrogen-Cavitation") mit einer Stickstoffbombe der Firma Artisan Industries, Mass., USA (Serie Nr. 46814). Die Zellsuspension wurde unter ständigem Rühren Stickstoff unter einem Druck von 60 at ausgesetzt (30 Minuten bei 4°C) und danach innerhalb weniger Sekunden durch ein Ventil in ein Gefäß außerhalb des Gerätes übergeleitet: Der plötzliche Abfall des Druckes auf Normalbedingungen führt zum Zerplatzen der Zellen.
- c) Homogenisierung mit einem Teflon-Glas-Homogenisator der Firma Braun, Melsungen (Nr. 854 250, 30 ml, Clearance 0,095 - 0,115 mm). Das Teflon-Pistill wurde durch einen Motor (Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau) mit 2000 rpm angetrieben, während das mit Eiswasser gekühlte Glasgefäß mit der Hand langsam auf und ab geführt wurde. Voraussetzung für eine zufriedenstellende Homogenisierung war ein straff sitzendes Pistill (Clearance!), da anderenfalls der Prozentsatz der homogenisierten Zellen zu niedrig oder die Zeitdauer des ganzen Vorganges zu lange war (> 15 Minuten).

Medien

Alle zur Homogenisierung verwendeten Medien waren mit Tris-HCl (0,005 M) auf pH 7,4 eingestellt, um eine Aktivierung von lysosomalen Enzymen unter sauren Bedingungen zu vermeiden. Nachdem aus der Literatur und von Vorversuchen her bekannt war, daß isotoner, elektrolythaltiger Puffer unbrauchbar war, wurden 4 verschiedene Medien auf ihre Eignung zur Homogenisierung menschlicher Granulozyten getestet:

- a) Hypotone NaCl-Lösung (0,2%), isotonisiert nach der Homogenisierung mit dem gleichen Volumen einer hypertonen NaCl-Lösung (1,6%);
- b) isotone Saccharose-Lösung (0,34 M);
- c) isotone Saccharose-Lösung + Heparin (50 U/ml);
- d) stark hypotone Saccharose-Lösung (0,1 M), isotonisiert nach der Homogenisierung mit dem gleichen Volumen einer 0,58 M Saccharose-Lösung.

Während der Homogenisierung in hypotonen Medien betrug die Zellkonzentration 1×10^8 /ml, um nach der Isotonisierung eine Endkonzentration von 5×10^7 Zellen/ml zu erreichen. Der ganze Vorgang wurde mikroskopisch kontrolliert (Toluidinblaufärbung) und so lange durchgeführt, bis etwa 90% der Zellen aufgeschlossen waren.

4.2 Auftrennung des Homogenates

4.2.1 Differentialzentrifugation

Die Differentialzentrifugation trennt homogen in einer Lösung verteilte Partikel abhängig von deren Größe und Form und von der Viskosität der Lösung. Wir benutzten gekühlte Zentrifugen der Firmen Christ und Beckman Instruments.

Das Homogenat wurde zuerst niedrigtourig zentrifugiert (400 g/15 Min), um intakte oder unvollständig aufgeschlossene Zellen und Kerne (Fraktion 1) zu entfernen. Der daraus resultierende "postnukleäre Überstand" wurde dann weiterverarbeitet bei 3000 g/15 Minuten (Fraktion 2), 20 000 g/15 Minuten (Fraktion 3) und 200 000 g/60 Minuten (Fraktion 4). Das Homogenat konnte somit grob in 5 Fraktionen unterteilt werden: 4 Sedimente, die in dem gleichen Medium und Volumen resuspendiert wurden, in dem die 5. Fraktion, der 200 000 g-Überstand, vorlag.

Da die Differentialzentrifugation in dieser Arbeit nur eine Vorreinigung zur Ultrazentrifugation darstellt, verzichteten wir meist auf eine wiederholte Homogenisierung und Zentrifugation, um die Fraktionierung zu beschleunigen. Dies wäre bei alleiniger Anwendung der Differentialzentrifugation notwendig gewesen, um eine gute Ausbeute und Trennung zu erreichen (39).

4.2.2 Dichtegradienten-Zentrifugation

Bei der Dichtegradienten-Zentrifugation wird das zu trennende Material entweder homogen verteilt, oder als Bande ("zonal") auf oder unter eine Flüssigkeitssäule gebracht, deren Dichte nach unten hin kontinuierlich oder diskontinuierlich zunimmt ("Gradient"). Der Gradient wird durch steigende Konzentrationen von Saccharose, Ficoll, CsCl u. a. aufgebaut. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten der Trennung: Die Dichtegradienten-Differentialzentrifugation ("velocity sedimentation", "kinetic gradient centrifugation") trennt wie die normale Differentialzentrifugation die Teilchen aufgrund ihrer Größe und Form. Der Gradient stabilisiert hier nur die Sedimentation; seine Dichte muß daher an jedem Punkt geringer als die Dichte der zu trennenden Partikel sein, die in unterschiedlich schnell wandernden Banden zum Boden des Gradienten sedimentieren.

In dieser Arbeit wird die 2. Methode angewandt, die Isopyknische Gradientenzentrifugation ("equilibrium gradient centrifugation", "isopycnic equilibration"). Sie trennt die Teilchen vor allem aufgrund ihrer Dichte: Die Partikel sedimentieren oder flotieren bis zu der Position im Gradienten, deren Dichte ihrer eigenen entspricht. Mit gewissen Einschränkungen (39, 40) ist es also möglich, die Dichte der Zellbestandteile zu bestimmen.

Die hier beschriebenen kontinuierlichen Gradienten bestanden aus gepufferten Saccharoselösungen (Tris-HCl, 0,005 M, pH 7,4), die mit einem manuell betriebenen Gradientenmischer aufgebaut wurden. Wir benutzten Schwingbecherrotoren (SW 27, 40, 65) der Beckman Spinco L2/65B-Ultrazentrifuge, die mit 100 000 g (Bezugspunkt war die Spitze der Röhrchen) über 8 - 12 Stunden zentrifugiert wurden. Nach dem Lauf wurden die Polycarbonatröhrchen an der Spitze angestochen und der Inhalt in 17 - 21 Fraktionen gleichen Volumens unterteilt, deren Dichte wir mit einem Zeiss-Refraktometer (Nr. 79758) bestimmten. Daraufhin mußten alle Fraktionen auf die gleiche Saccharosekonzentration - bei gleicher Volumenveränderung! - gebracht werden, um die Bedingungen für die weiteren Analysen zu vereinheitlichen. (Die genaue Zusammensetzung des aufgetragenen Materials wird in Abschnitt IV beschrieben.)

Wir versuchten, bei allen Schritten die von de Duve u. a. erarbeiteten Prinzipien zu berücksichtigen (39, 40). Insbesondere wurde darauf geachtet, die ganze Trennung möglichst schnell bei 4°C durchzuführen und das Material quantitativ zu verarbeiten (d.h. alle Zellfraktionen in die Bestimmungen einzubeziehen), um einen lückenlosen Überblick über das Verteilungsmuster der einzelnen Substanzen zu erhalten. (Kontrolle: siehe "recovery", Seite 52).

5. Analyse der Zellstimulierung und subzellulären Fraktionierung

5.1 Chemotaxis

Seit den Untersuchungen Pfeffers (1884) wurden unzählige Methoden zur Messung dieses Phänomens entwickelt (50, 145): Bei den in vivo-Ver-suchen wandern Zellen aus lebendem Gewebe in ein Kompartiment, das chemotaktische Substanzen enthält und können dort quantitativ und quali-tativ bestimmt werden (z. B. Kapillarröhrchen- oder skin-window-Metho-de). Bei anderen Techniken wird die Reaktion der Zellen auf die Zufuhr chemotaktischer Substanzen direkt im Mikroskop beobachtet (z. B. Kanin-chenohr oder Mesenterium). Der Nachteil dieser Verfahren liegt darin, daß die an dem Geschehen beteiligten Faktoren (Gefäßreaktionen, Serum-bestandteile usw.) kaum zu kontrollieren sind. Es wurden daher in vitro-Experimente durchgeführt (z. B. Beobachtung der Zellwanderung unter definierten Bedingungen auf einem Objektträger), unter denen die Kammer-Methode von Boyden (17) am besten untersucht und daher zur Zeit am weitesten verbreitet ist.

Methode

Die hier verwendeten modifizierten Boyden-Kammern aus Plexiglas bestehen aus einem Hohlraumsystem, das durch einen Filter in eine untere Kammer für das Chemotaxans (A) und eine obere für die Ziel-zellen (B) unterteilt wird (Abb. 6).

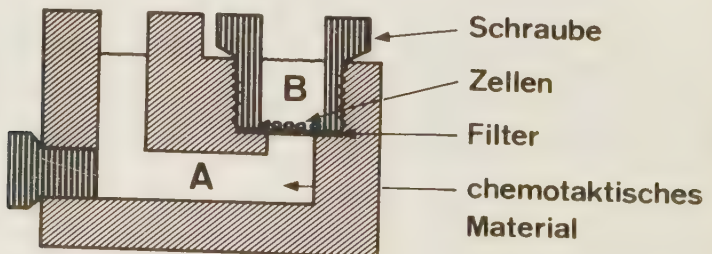


Abb. 6 : Modifizierte Boyden-Kammer; Beschreibung im Text.

Zur Vorbereitung des Tests wird ein Filter mit einem Durchmesser von 13 mm (Sartorius Membranfilter, Göttingen) und einer Porengröße von 8 μm (Meerschweinchen-Eosinophile) oder 3 μm (Meerschweinchen-Neutrophile) in die Kammer eingelegt und mit einer durchbohrten Schraube fixiert. 1,2 ml der in TACM-Puffer verdünnten Testsubstanz werden in die untere (A) und danach 0,5 ml der Zellsuspension ($2,5 \times 10^6$ Zellen) in die obere Kammer (B) eingefüllt.

Während der nun folgenden Inkubationszeit (3 Stunden bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit) wandern die Leukozyten bei positiver Chemotaxis in den Filter hinein und bis zu dessen Unterseite, wo sie zum größten Teil hängen bleiben (36). Nach der Inkubation wird das Material aus der unteren Kammer entfernt, die Filter werden entnommen und sofort gefärbt (siehe Material und Methoden, 1.2). Die gefärbten und getrockneten Filter werden durch kurzes Eintauchen in Xylol durchsichtig und können mit Kanadabalsam auf einem Objektträger fixiert werden.

Prinzipiell bestehen 2 Möglichkeiten, die Filter auszuwerten (84): Entweder man mißt die Strecke im Filter, die die führenden Zellen nach kurzer Inkubationszeit vom Startpunkt aus zurückgelegt haben ("leading front-Methode"), oder man zählt die Leukozyten, die nach entsprechend längerer Inkubationszeit bis zu einer festgelegten Ebene oder durch den ganzen Filter hindurch gewandert sind ("Zählmethode").

In dieser Arbeit wurden normalerweise die Zellen, die den Filter vollständig durchwandert hatten, auf dessen Unterseite in 5 Gesichtsfeldern (5 HPF = high power field, Vergrößerung: 12,5 x 40) ausgezählt (Abb. 7). Nur bei schwacher Chemotaxis (Abb. 17, 18, 20) wurde die "leading front-Methode" angewandt. Der Variationskoeffizient des Assays lag konzentrationsabhängig bei 12 - 16% (errechnet aus jeweils 12 Bestimmungen der gleichen ECF-Probe) und Linearität ließ sich in einem Bereich von etwa 300 - 1300 Eosinophilen/5 HPF nachweisen (Abb. 8).

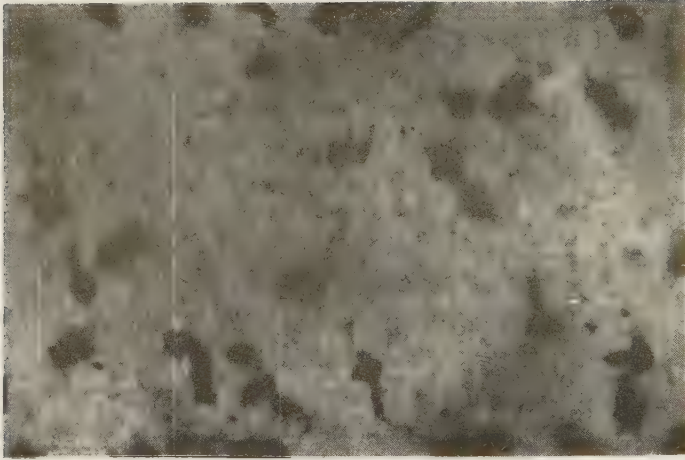


Abb. 7 :

Blick auf die Unterseite eines gefärbten Filters der Boyden-Kammer bei positiver Chemotaxis von Meerschweinchen-Eosinophilen, ausgelöst durch den Eosinophil-Chemotaktischen Faktor (ECF) aus menschlichen neutrophilen Granulozyten; der Ausschnitt entspricht etwa 30 % der Fläche eines Gesichtsfeldes bei der für die Auswertung angegebenen Vergrößerung ("HPF").

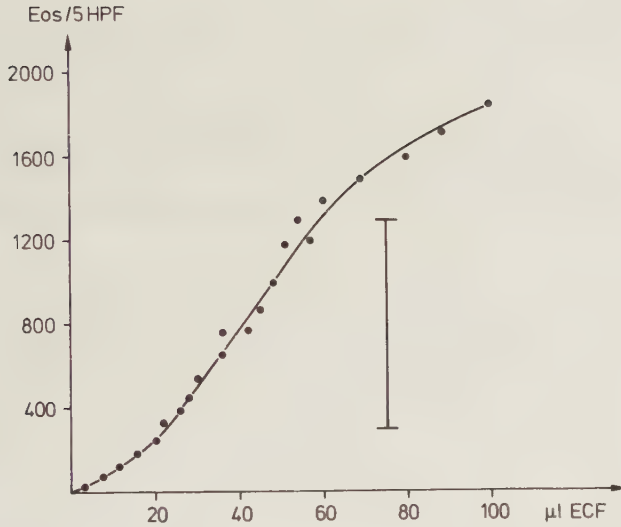


Abb. 8 :

Zahl der Eosinophilen / 5 HPF (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen) aufgetragen gegen den Einsatz steigender Konzentrationen von ECF in der Boyden-Kammer; Linearität läßt sich in einem Bereich von etwa 300 - 1300 Eos/5 HPF nachweisen.

Zellen

Die chemotaktische Aktivität von ECF aus menschlichen neutrophilen Granulozyten wurde mit Meerschweinchen-Eosinophilen (Abb. 5, Seite 29) ausgetestet, nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß diese sich unter den angegebenen Bedingungen ähnlich verhalten wie menschliche Zellen (35). Meerschweinchen-Neutrophile dienten als Kontrolle der Spezifität der Eosinophilen-Chemotaxis.

Eosinophile Zellen wurden in Anlehnung an eine Methode von Litt (100) gewonnen: Meerschweinchen erhielten einmal pro Woche eine intraperitoneale Injektion von humanem Serum (2-3 ml) und entwickelten daraufhin nach etwa einem Monat ein eosinophilenreiches Peritonealexsudat. Ein Exsudat aus neutrophilen Granulozyten erhält man 15-18 Stunden nach einer einmaligen intraperitonealen Injektion einer sterilen Glykogenlösung (20 ml, 0,1% in physiologischem Puffer (145)). Zum Auswaschen der Zellen wurden 20 ml einer sterilen Glukoselösung (5% in H_2O) intraperitoneal injiziert. 2-3 Stunden später kann dann die zellreiche Flüssigkeit durch Punktion der Peritonealhöhle unter Äthernarkose abgelassen werden.

Die Leukozyten wurden mehrfach in TACM gewaschen und zur Chemotaxis auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Nur Leukozytensuspensionen folgender Zusammensetzung wurden in der Boyden-Kammer eingesetzt:

<u>Eosinophilen-Chemotaxis:</u>	30 - 75 % Eosinophile, < 1 % Neutrophile;
<u>Neutrophilen-Chemotaxis:</u>	1 % Eosinophile, > 90 % Neutrophile.

Der Rest der Zellen bestand aus nicht näher definierbaren, großen, mononukleären Zellen (Peritonealdeckzellen u. a.). Geringe Verunreinigungen durch Erythrozyten wurden durch hypotone NaCl-Lyse beseitigt (siehe PMN-Reinigung).

Einsatz der Testsubstanzen

Da es sich bei dieser Methode um ein biologisches Testsystem handelt, ist der Einsatz von Proben nur insoweit möglich, als das Milieu noch ein Wandern der Zellen zuläßt. Da aber ECF ein Molekül mit einem Molekulargewicht unter 1000 ist, wird durch Dialyse störender Substanzen auch die chemotaktische Aktivität entfernt; die sich anbietende Chromatographie ist zwar möglich, aber zur routinemäßigen Anwendung zu aufwendig. Bei jeder Chemotaxis lief daher eine negative (Puffer) und positive Kontrolle mit: ECF bekannter Aktivität aus dem Überstand Ionophore- oder Zx-stimulierter Leukozyten ("ECF-Standard") bei eosinophiler, und Casein (1-10 mg/ml) bei neutrophiler Chemotaxis. Dieses Material wurde jeweils in dem gleichen Medium gelöst, in dem auch die Probe vorlag. Durch dieses Vorgehen wurden folgende Effekte beobachtet:

Hemmung der Chemotaxis um 50 % durch

Saccharose (45 mg/ml), Heparin (105 U/ml), CaCl_2 (40 mM), MgCl_2 (50 mM), CaCl_2 + MgCl_2 (je 24 mM), EDTA (1 mM), EGTA (0,5 mM), Triton X-100 (0,075 mg/ml), Nonidet P 40 (0,04 mg/ml), Deoxycholat (0,05 mg/ml), KCl (30 mM).

Steigerung der Chemotaxis um 20 - 50 % durch

CaCl_2 (5 mM), MgCl_2 (4 mM), CaCl_2 + MgCl_2 (je 3 mM).
(Angaben = mittlere Konzentrationen in der unteren Kammer !)

Diese Daten lassen erkennen, daß wegen des hohen Saccharosegehalts nur 100 - 200 µl der Zellfraktionen eingesetzt werden konnten, die auf dem Dichtegradienten isoliert wurden. Die chemotaktische Aktivität war entsprechend niedrig, und auch die Daten aus Experimenten mit Detergentien und hoch konzentrierten Salzlösungen waren aus dem gleichen Grund nur sehr schwer zu beurteilen.

Prinzipiell wurden alle Proben auf Eigenaktivität hin untersucht ("ECF": Einsatz von 100 - 500 µl Probe in 1,2 ml TACM) oder ihre

Fähigkeit, ECF bekannter Aktivität zu inaktivieren ("Inaktivator": 100 - 500 µl Probe + 50 - 200 µl Standard-ECF in 1,2 ml TACM). Wenn das inaktivierende Material in konzentrierter, partikulärer Form (sonicierte Granula!) ausgetestet werden sollte, wurde es vor Einsatz in der Boyden-Kammer mit ECF inkubiert (30 Min, 37°C) und danach hochtourig abzentrifugiert. Dadurch ließ sich eine Verunreinigung der Filter vermeiden. Prinzipiell gleiche Ergebnisse wurden jedoch auch bei Verwendung nicht vorinkubierter und abzentrifugierter Gemische erzielt, da in beiden Fällen ohnehin eine 3-stündige Inkubation in der Boyden-Kammer erfolgte. Die hier gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte aus Auswertungen, die mindestens im Duplikat durchgeführt wurden.

5.2 Biochemische Bestimmungen

Alle photometrischen Messungen wurden mit einem Carl-Zeiss-Photometer (M 4 QIII/PM QII) durchgeführt.

Protein

wurde mit einer modifizierten Methode nach Lowry gemessen, die SDS zur Auflösung partikulärer Proben verwendet (25).

200 µl Probe

+ 50 µl frisch angesetzte SDS-Lösung

(Natriumdodecylsulfat (SDS), 2,5% + Na₂CO₃, 0,5 M
in Aqua dest.)

+ 1000 µl frisch angesetzte Lowry A-Lösung

(1 ml Natriumtartrat, 2% in Aqua dest. + 1 ml CuSO₄, 1%
in Aqua dest. + 100 ml Na₂CO₃, 2% in NaOH, 0,1 N)



10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen

+ 100 µl Lowry B = Folin-Ciocalteu-Reagenz



30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen

Bestimmung der Extinktion bei 750 nm.

Humanes Serumalbumin in dem gleichen Medium wie die zu testende Substanz diente als Standard.

DNA

wurde in Anlehnung an Burton (23) bestimmt:

200 - 500 μ l der Probe werden mit eiskalter Trichloressigsäure (10 %, 10 ml) präzipitiert, um Saccharose zu entfernen, die in diesem Test interferiert. Man resuspendiert nun das Präzipitat in NaOH (1 N, 0,1 ml), und kurz vor der eigentlichen DNA-Stimmung gibt man HClO_4 (0,5 N, 0,4 ml) hinzu. 2 Teile des Dische-Reagens (1,5 g Diphenylamin, 8 mg Acetaldehyd und 1,5 ml konz. H_2SO_4 in 100 ml Eisessig) werden mit dieser DNA-Lösung bei 37°C (16 - 20 Stunden) inkubiert. Die Intensität des blauen Farbkomplexes wird bei 595 nm gemessen; Kälber-Thymus-DNA diente als Standard.

Enzyme

Zur Identifizierung der gewonnenen Zellstrukturen wurden Enzyme gemessen, die auch bei vielen anderen Geweben als "Leitenzyme" bestimmter Zellstrukturen verwendet werden.

- Succinatdehydrogenase in Leber-Mitochondrien (42);
- Peroxidase und saure Hydrolasen wie β -Glucuronidase und saure β -Glycero-Phosphatase in azurophilen sowie Lysozym auch in den spezifischen Neutrophilen-Granula (20);
- Cathepsin-D in Leber-Lysosomen (45);
- saure und alkalische p-Nitrophenyl-Phosphatase in einer "Membranfraktion" menschlicher Granulozyten (20);
- Glukose-6-Phosphatase im Endoplasmatischen Retikulum der Leber (10);
- Mg-ATPase in der Plasmamembran von Granulozyten (63), 5'-Nukleotidase und alkalische Phosphodiesterase I in der Plasmamembran der Leber und anderer Gewebe (10, 123);
- Laktatdehydrogenase im Zytoplasma der meisten Zellen (12, 121).

Einen Überblick über die Enzymbestimmungen gibt die Tabelle 1. Puffer, Substrate und Zusätze wurden in 10facher Konzentration angesetzt und mit Aqua dest. auf ein Inkubationsvolumen (incl. Probe) von 1 ml verdünnt; nur zur Lysozym-Bestimmung wurden 0,05 ml Probe mit 1,25 ml Substratlösung inkubiert. Alle Konzentrationsangaben entsprechen Endkonzentrationen im fertigen Inkubationsansatz.

Succinatdehydrogenase (EC 1.3.99.1) konnte mit der angegebenen Methode in menschlichen neutrophilen Granulozyten nicht nachgewiesen werden, während Rattenleberhomogenate hohe Aktivitäten zeigten.

Cathepsin-D (EC 3.4.4.23) wurde nur zu Beginn der Arbeit gemessen. Der Test wurde später nicht mehr durchgeführt, da andere Granula-Marker bequemer, sensitiver, vor allem aber besser reproduzierbar zu bestimmen waren.

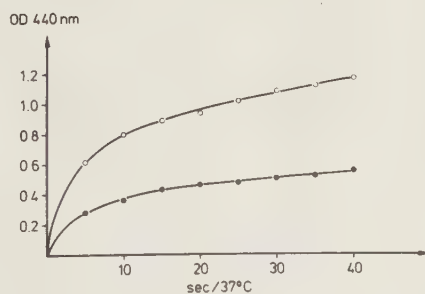
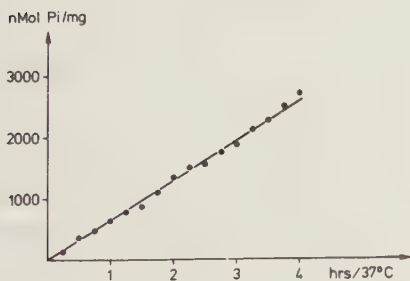
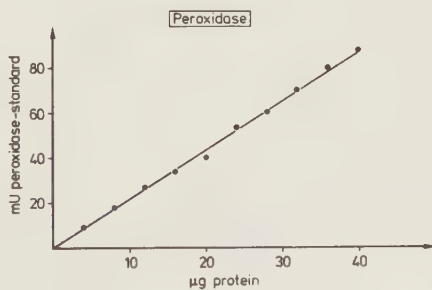
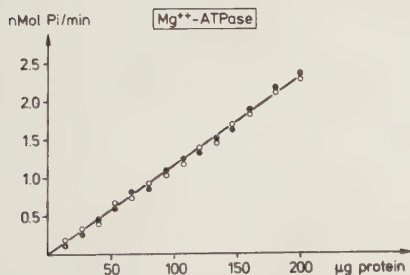
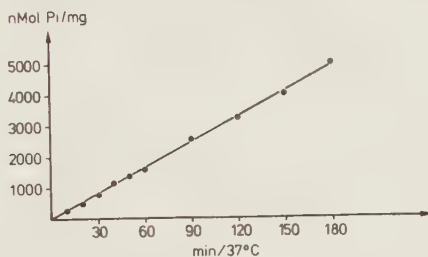
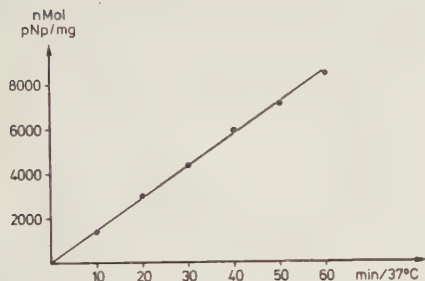
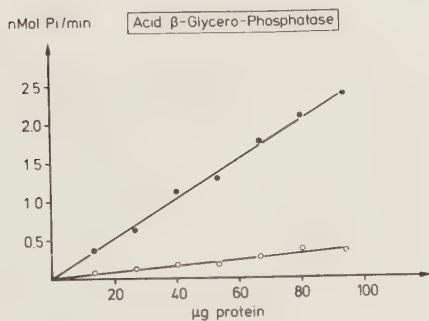
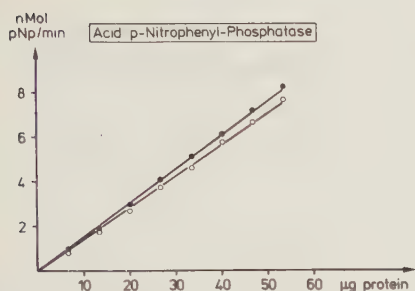
Einige Enzym-Assays wurden für menschliche PMNs modifiziert, was Inkubationszeit, Substratkonzentration, Puffer oder Stoppervolumen betrifft. Dadurch wurde z. B. der ATPase-Assay etwa zehnmal sensitiver als der von Harlan u. a. beschriebene Test, der (^{32}P)ATP verwendet (63), obwohl nicht hydrolisiertes ATP hohe Leerwertextinktionen ergibt. Alle modifizierten Assays erwiesen sich als linear sowohl in Bezug auf die angegebene Inkubationszeit als auch auf die eingesetzte Proteinkonzentrationen (Abb. 9).

Enzym	pH	Puffer	Substrat	Zusätze	Inkubationszeit / -temp.	Stopper	Reaktions-Indikator	Ref.
Succinat-dehydrogenase	8,0	Tris-HCl 0,1 M	Succinat 50 mM	INT (-2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid) 0,01%	15-40 Min. 37°C	Äthylacetat 2 ml	Formazan (490 nm)	142
Peroxidase	5,0	Citrat-Puffer 0,1 M	H ₂ O ₂ 1 mM	o-Tolidin in Äthanol 0,5 mM	20 Sek. 25°C	H ₂ SO ₄ 1,5 M 0,5 ml	oxidiertes Substrat (440 nm)	3
saure β-Glycero-Phosphatase	5,0	Acetat-Puffer 0,1 M	β-Glycero-Phosphat 50 mM	-	30-60 Min. 37°C	TCA 16% 0,5 ml	anorgan. Phosphat (n. Chen)	1 16 26
β-Glucuronidase	5,0	Acetat-Puffer 0,05 M	Phenolphthaleinglucuronid 1 mM	Triton X-100 0,05%	8-18 Std. 37°C	Na ₂ CO ₃ 0,75 M 1,0 ml	Phenolphthalein (540 nm)	1 16 45
Cathepsin-D	3,6	Acetat-Puffer 0,1 M	denatur. Hämoglobin 2,5%	-	2 Stunden 37°C	TCA 8% 1,0 ml	TCA-lösl. Peptide (n. Lowry)	16 25 45
Lysozym	6,2	Phosphat-Puffer	Micrococcus lysodeictic. ~0,01% Ext.: 0,6-0,7	-	2-4 Min. 25°C	-	Extinktionsdifferenz (450 nm)	122 125
Alkal. p-Nitrophenyl-Phosphatase	10,0	Tris-HCl 0,05 M	p-Nitrophenylphosphat 8 mM	Triton X-100 0,05%	3 Stunden 37°C	Na ₂ CO ₃ 0,75 M 1,0 ml	p-Nitrophenol (420 nm)	12

saure p-Nitrophenyl- Phosphatase	5, 0	Acetat- Puffer 0, 2 M	p-Nitro- phenyl- phosphat 8 mM	Triton X-100 0, 05 %	15-30 Min. 37°C	Tris-HCl 1, 0 M Na ₂ HPO ₄ 0, 4 M pH 8,5 1, 0 ml	p-Nitro- phenol (420 nm)	45
Mg-ATPase	7, 4	Tris-HCl 0, 1 M	Adenosin- triphosphat 1, 0 mM	MgCl ₂ 2 mM	3 Stunden 37°C	TCA 7 % 7 ml	anorgan. Phosphat (n. Chen)	26 63
Glukose-6- Phosphatase	6, 5	Citrat- Puffer 0, 1 M	Glukose-6- Phosphat 40 mM	EDTA, 1 mM (Na-Tartrat, 10 mM)	15 Stunden 37°C	TCA 10 % 4 ml	anorgan. Phosphat (n. Chen)	10 26
5'-Nucleoti- dase	7, 5	Tris-HCl 0, 05 M	Adenosin- mono- phosphat 5 mM	KCl, 40 mM MgCl ₂ , 50 mM (Na-Tartrat, 10 mM)	6 Stunden 37°C	TCA 16 % 0, 5 ml	anorgan. Phosphat (n. Chen)	12 26
alkalische Phospho- diesterase I	9, 6	Glycin- NaOH 0, 1 M	p-Nitrophe- nylthymidin- 5-phosphat 1, 5 mM	Zinkacetat 2 mM	16 Stunden 37°C	NaOH 0, 2 M 1, 0 ml	p-Nitro- phenol (420 nm)	10
Lactatde- hydrogenase	7, 5	Phosphat- Puffer 0, 05 M	Natrium- pyruvat 0, 44 mM	NADH, 0, 1 mM (Triton X-100, 0, 01 %)	2-4 Min. 25°C	-	Extink- tionsdiffe- renz (365 nm)	12 21

Übersicht über die Bedingungen der in dieser Arbeit verwendeten Enzym-Assays. Die fertige Inkubationslösung (Endvolumen: 1 ml) bestand aus 50-400 µl der Testsubstanz sowie dem jeweiligen Puffer, Substrat und Zusatz in den angegebenen Konzentrationen. Mit Ausnahme von Lysozym und Laktatdehydrogenase (Bestimmung der Aktivität über Messung der Extinktionsabnahme pro Minute) wurden die Reaktionen nach einer festgelegten Inkubationszeit gestoppt und ein Reaktionsprodukt direkt (Formazan, oxidiertes Tolidin, Phenolphthalein, p-Nitrophenol) oder indirekt (anorgan. Phosphat nach Chen (26), lösliche Peptide nach Lowry (25)) photometrisch gemessen. Die Konzentrationen dieser Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe von Standardlösungen ermittelt und die enzymatischen Aktivitäten weiter unten beschrieben berechnet.

Tabelle 1 :



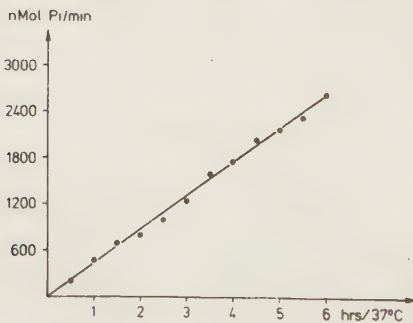
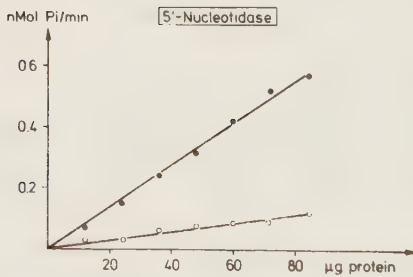
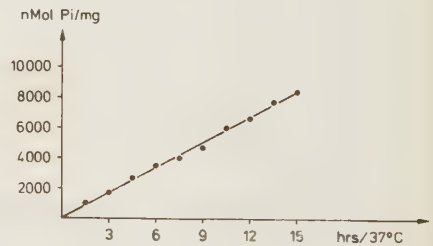
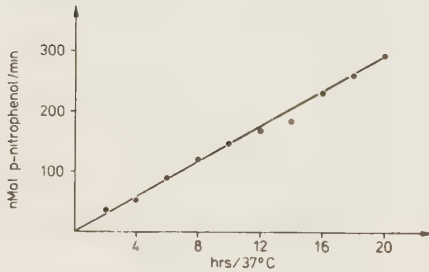
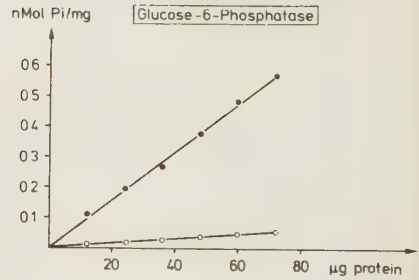
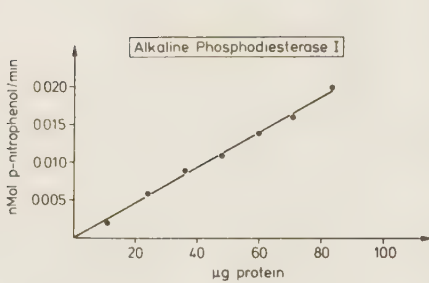


Abb. 9 :

Charakteristika einiger Enzym-Assays, die in dieser Arbeit gegenüber der Originalliteratur abgeändert wurden. Der Substratumsatz erwies sich unter den in Tabelle 1 angeführten Bedingungen als linear sowohl in Bezug auf die Inkubationszeit als auch auf die eingesetzte Proteinkonzentration.

In allen Phosphatase-Assays wurde der Effekt von Natriumtartrat (10 mM) ausgetestet, um den Beitrag der lysosomalen Phosphatase(n) abschätzen zu können. Tabelle 2 zeigt, daß erwartungsgemäß die granuläre β -Glycero-Phosphatase stark gehemmt, während Mg-ATPase und saure p-NP-Phosphatase nicht oder kaum beeinflusst werden. Die starke Hemmung der 5'-Nukleotidase und Glukose-6-Phosphatase läßt vermuten, daß in diesem Fall die Substrate von anderen, unspezifischen (lysosomalen) Phosphatasen umgesetzt werden. Diese beiden Enzyme sind also nicht oder in nur sehr geringer Konzentration in menschlichen PMNs vorhanden.

	Homogenat	Zellfraktionen				
		1	2	3	4	5
β -Glycero-Phosphatase	85	92	100	100	90	65
saure p-NP-Phosphatase	7	3	10	12	2	0
Mg-ATPase	0	0	0	0	0	0
5'-Nukleotidase ⁺	78	50	80	91	18	2
Glukose-6-Phosphatase ⁺	90	67	92	100	85	65

Tabelle 2 : Hemmung der Aktivität von Phosphatasen in Homogenat und Zellfraktionen neutrophiler Granulozyten durch Natriumtartrat (10 mM). Die Werte entsprechen Prozentangaben der Enzymaktivitäten ohne Tartrat.
(+ = Enzyme, die nicht sicher in menschlichen Granulozyten nachgewiesen werden konnten)

Enzymeinheiten

Mit Ausnahme von Lysozym sind alle Enzymaktivitäten nach der internationalen Definition angegeben: "Eine internationale Einheit ($U = \text{Unit}$) ist die Enzymaktivität, welche die Umwandlung von $1 \mu\text{Mol}$ Substrat in einer Minute unter Standardbedingungen katalysiert (12)." Da die Bedingungen, unter denen die angegebenen Enzyme bestimmt werden, noch nicht völlig vereinheitlicht sind, beziehen sich die hier angegebenen Aktivitäten streng auf die in dieser Arbeit angeführten Meßbedingungen !

Als Standards wurden verwendet: Na_2HPO_4 (saure β -Glycerophosphatase, Mg^{++} -ATPase, 5' -Nukleotidase, Glukose-6-Phosphatase), p-Nitrophenol (alkalische p-NP-Phosphatase, saure p-NP-Phosphatase, alkalische Phosphodiesterase I) und Phenolphthalein (β -Glucuronidase). LDH-Aktivität wurde mit Hilfe des mikromolaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 3,3 \text{ cm}^3/\mu\text{Mol}$) nach Bergmeyer (12) bestimmt. Meerrettich-Peroxidase diente als Standard für die Bestimmung der Peroxidase. 1 U Lysozym wurde nach Spitznagel (125) als die Enzymmenge definiert, die bei 450 nm zu einem Extinktionsabfall von 10,0 /Minute führt.

Die spezifische Aktivität (Tab. 3) gibt die Enzymaktivität in mU pro mg Zellprotein an und ist ein Maß für die Konzentration bzw. Reinheit eines Enzyms.

	SA	±	SD	(n)
Peroxidase	1640	±	398	(17)
Lysozym	115	±	31	(17)
β-Glucuronidase	2,00	±	0,69	(17)
β-Glycero-Phosphatase	26,0	±	5,8	(13)
saure p-NP-Phosphatase	132	±	31	(17)
alkalische p-NP-Phosphatase	4,43	±	1,84	(17)
Mg-ATPase	13,6	±	3,4	(13)
Laktatdehydrogenase	998	±	215	(13)

Tabelle 3 : Spezifische Aktivitäten (SA = mU/mg Protein)
 ± Standard-Abweichungen (SD) von Enzymen
 im Homogenat neutrophiler Granulozyten
 (n = Anzahl der Bestimmungen).

Präzision der Bestimmungen :

Im folgenden sind die mittleren Variationskoeffizienten (= Standardabweichungen in „% des Mittelwertes“) der Assays angegeben. Sie repräsentieren Mittelwerte aus 6 Experimenten, in denen die gleiche Probe 7 x hintereinander bestimmt und daraus der Variationskoeffizient berechnet wurde.

Protein	3,5 %
DNA	8,6 %
Peroxidase	4,8 %
Lysozym	4,2 %
β-Glucuronidase	3,2 %
β-Glycero-Phosphatase	7,8 %
saure p-NP-Phosphatase	5,7 %
alkalische p-NP-Phosphatase	5,8 %
Mg ⁺⁺ -ATPase	8,8 %
LDH	4,0 %

Recovery

Zur Kontrolle der Zellfraktionierungen wurde parallel zu den Hauptexperimenten die Summe der in den einzelnen Zellfraktionen enthaltenen Enzyme dem Enzymgehalt der nicht aufgetrennten Granulozyten (Tab. 3) gegenübergestellt. Diese "Bilanzierung" sollte Verluste oder Enzymaktivierungen während der Isolierung der Organellen aufdecken. Die quantitative Ausbeute ("recovery") lag bei der Differentialzentrifugation zwischen 80 und 110% und bei der Dichtegradientenzentrifugation zwischen 60 und 105%. Niedrigere Werte, d.h. Verluste oder Inaktivierung, wurden v.a. bei Membranenzymen gemessen, während die Ausbeute an Granulamarkern meist höher lag. Werte über 100% lassen sich dadurch erklären, daß die entsprechenden Enzymaktivitäten im Gemisch des Homogenates trotz Sonication noch latent vorliegen oder von anderen Zellbestandteilen (z.B. im Zytoplasma) gehemmt werden.

5.3 Gel-Chromatographie

Die Charakterisierung von Material mit ECF- oder ECF-inaktivierenden Aktivität erfolgte durch Gelfiltration über Sephadex G 10, G 25 und G 200. Jeweils 0,5 - 1,0 ml der erhaltenen Fraktionen wurden in der Chemotaxis auf ECF- oder Inaktivator-Aktivität hin ausgetestet.

Analyse von ECF-haltigem Material

Eosinophilotaktisches Material (0,2 - 0,8 ml) aus dem Überstand von Granulozyten, die mit Ionophore oder Zx stimuliert worden waren (ECF-I, ECF-Zx), lysierten Zellen (ECF-lysis) oder chemotaktisch aktiven Zellfraktionen (200 000 g-Sediment = ECF 4 und 200 000 g-Überstand = ECF 5) wurden auf eine kleine Sephadex G 25 -Säule (1,6 x 25 cm) aufgetragen. Das Material wurde deszendierend mit

TCM-Puffer eluiert und mit Hilfe eines LKB-Fraktionskollektors (Ultrorac 7000) in Fraktionen von 1,35 ml (Abb. 16) oder 2 ml (Abb. 22) unterteilt. Wir verwendeten diese kleine Säule routinemäßig, um chemotaktische Aktivitäten aus verschiedenen Quellen miteinander zu vergleichen.

Um die Fraktionen mit chemotaktischer Aktivität genauer zu charakterisieren, wurden 0,5 ml von - durch Lyophilisierung etwa 10-fach konzentrierten - Überständen stimulierter Zellen (ECF-I, ECF-Zx) auf eine größere Sephadex G 10-Säule (2,5 x 37 cm) aufgetragen, mit TCM-Puffer aszendierend eluiert und in Fraktionen von 1,35 ml unterteilt (Abb. 12).

Die Säulen ließen sich mit folgenden Eichsubstanzen kalibrieren: Dextran blau ($\text{MG } 2 \times 10^6$) und Vitamin B₁₂ (MG 1355), photometrisch bestimmt bei 260 und 361 nm; Eialbumin (MG 45 000), gemessen mit der Proteinbestimmung nach Lowry (siehe vorne); ¹⁴Histamin (MG 111), nachgewiesen mit einem "TRI-CARB Liquid Scintillation Spectrometer" (Packard, Nr. 3255); Glukose (MG 180), Saccharose (MG 342) und Stachyose (MG 667), bestimmt nach einer Methode von Dubois u. a. (46): 500 µl Probe + 100 µl Phenol (12%) + 1500 µl konz. H₂SO₄, Extinktionsmessung bei 485 nm.

Analyse von ECF-inaktivierendem Material

Die ECF-inaktivierenden Granula-Fraktionen (3000 g und 20 000 g Sedimente) wurden im Eisbad soniciert (5 x 15 Sekunden) und mitteltourig abzentrifugiert (3000 g/10 Minuten). 1 ml des Überstandes wurde auf eine Sephadex G 200-Säule (2,5 x 27 cm) aufgetragen, mit TCM-Puffer aszendierend eluiert und in Fraktionen von 2,7 ml unterteilt (Abb 23).

Die Kalibrierung erfolgte mit Dextran blau ($\text{MG } 2 \times 10^6$), Lysozym (MG 15 000) und Saccharose (MG 342).

IV. ERGEBNISSE

1. Analyse der Granulozytenstimulierung

1.1 Ionophore und Phagozytose

ECF und Enzyme

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die Ergebnisse von Experimenten, in denen menschliche Granulozyten mit Ionophore A 23187 und komplementbeladenen Zymosanpartikeln (Phagozytose) stimuliert wurden. Das Muster der ECF-Freisetzung ähnelt dem der Abb. 1 in der Einleitung:

Mit Beginn der Stimulierung erscheint ECF im Zellüberstand und erreicht ein Maximum bei 4 - 12 Minuten in Gegenwart von Ionophore und bei etwa 12 Minuten während der Phagozytose. In den späteren Phasen der Sekretion nimmt die Aktivität wieder ab. In diesem Fall kommt es jedoch deutlicher als in Abb. 1 zu einem zweiten Aktivitätsanstieg nach 30 - 40 Minuten. Dieser späte Aktivitätsgipfel war schon in früheren Experimenten aufgefallen (93). Das Freisetzungsmuster war - wie bereits in der Einleitung erwähnt - individuell sehr unterschiedlich, und der Aktivitätsabfall in späteren Phasen konnte in Phagozytoseexperimenten meist ausgeprägter nachgewiesen werden als mit Ionophore. Die Austestung von Sonication der stimulierten und abzentrifugierten Zellen ergab eine ähnliche Kinetik wie die des zellfreien Überstandes. Die chemotaktische Aktivität war jedoch meist niedriger und konnte schon etwas früher (innerhalb von 2 Minuten) als im Überstand nachgewiesen werden (siehe Diskussion).

Das entscheidende an diesen Abbildungen ist jedoch der deutliche Unterschied zwischen der schnellen ECF-Freisetzung und dem Verhalten der Enzyme: Diese erscheinen ganz allmählich im Inkubationsmedium und lassen erst nach 20 bzw. 40 Minuten ein angedeutetes Plateau erkennen. Freigesetzt werden offensichtlich nur granuläre

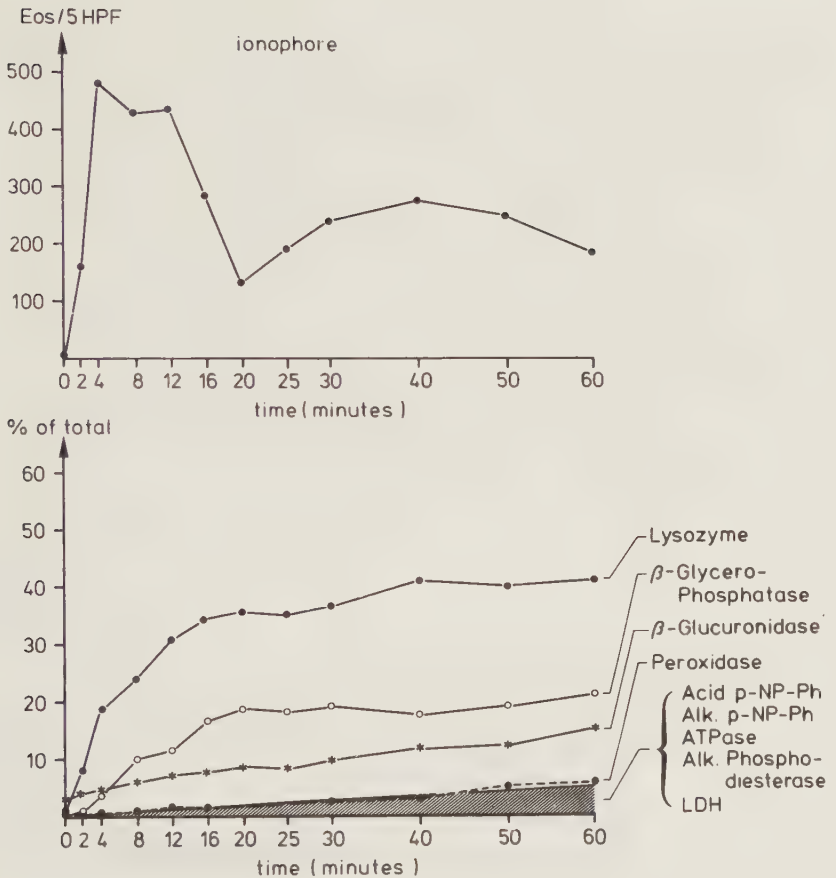


Abb. 10 : Stimulierung neutrophiler Granulozyten mit Ionophore A 23187.
 Oben: Chemotaktische Aktivität des Zellüberstandes (ECF-I);
 unten: Enzymatische Aktivitäten des Zellüberstandes.
 Die Enzymaktivität ist in % des totalen Enzymgehaltes der Zellen angegeben, da dieser leicht durch Sonication zu bestimmen und durch reziproke Veränderungen in Überstand und Sediment zu kontrollieren ist. Die ECF-Aktivität mußte in Absolutwerten (Eos/5 HPF) dargestellt werden, da die Gesamtmenge an ECF pro Zelle nicht zu bestimmen ist, weil der Faktor im Gegensatz zu den Enzymen nicht präformiert gespeichert ist.

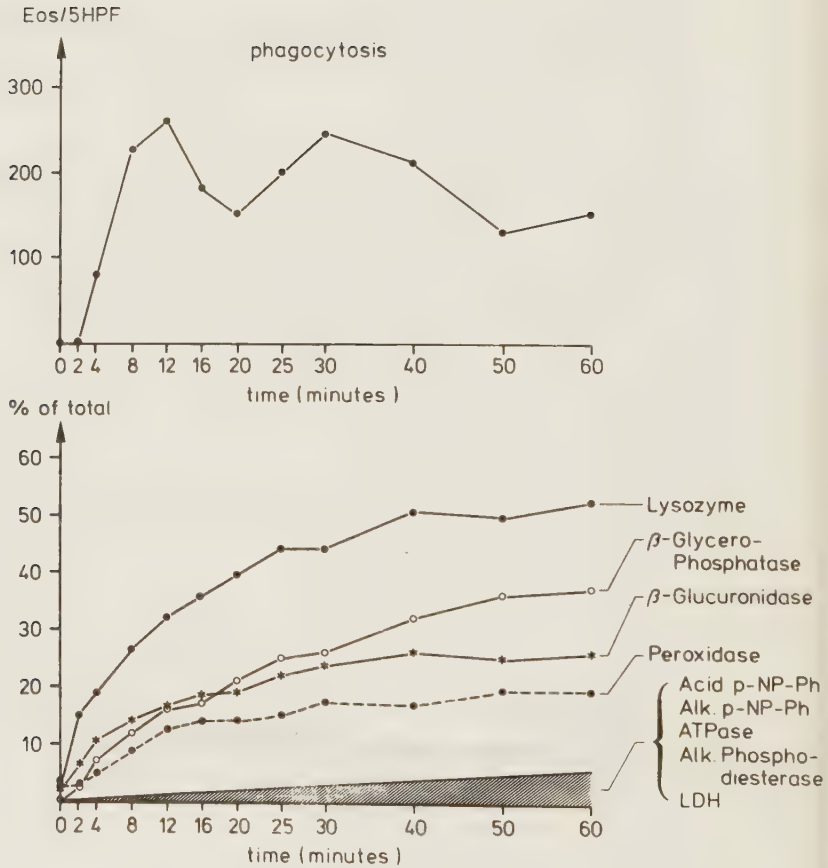


Abb. 11 : ECF- und Enzymfreisetzung aus neutrophilen Granulozyten während der Phagozytose von opsonisierten Zymosanpartikeln (Zx). Darstellung wie in Abb. 10.

Enzyme und zwar bevorzugt Lysozym (40 % bzw. 50 %) und β -Glycero-Phosphatase (20 % bzw. 40 %). Beide Methoden der Zellaktivierung setzen β -Glucuronidase frei (15 % bzw. 25 %), während offenbar nur die Phagozytose zu einer deutlichen Sekretion von Peroxidase führt (20 %). Laktatdehydrogenase (Leitenzym für das Zytoplasma) bleibt wie die übrigen ausgetesteten Enzyme zellgebunden, d.h. die Stimulation ist nicht zytotoxisch. Ionophore löst regelmäßig eine stärkere ECF-Freisetzung aus als die Phagozytose, während im Hinblick auf die Enzyme die Phagozytose der stärkere Stimulus zu sein scheint.

Die unterschiedliche Kinetik der Freisetzung von ECF und granulären Enzymen legt die Vermutung nahe, daß ECF im Gegensatz zu ECF-A nicht in den Granula der Zellen gespeichert vorliegt; außerdem scheint die ECF-Produktion ein sehr frühes Ereignis im Rahmen der Zellaktivierung zu sein.

Gelfiltration

In den ersten Arbeiten über ECF wurde bereits das ungefähre Molekulargewicht durch Gelfiltration über Sephadex G 25 bestimmt: Die Hauptaktivität eluierte zwischen den Molekulargewichtsmarkern Histamin (MG 111) und Vitamin B₁₂ (MG 1355); eine zusätzliche Aktivität im Ausschlußvolumen der Säule war auch chemotaktisch für neutrophile Zellen (35, 36, 42). Zur genaueren Analyse des Molekulargewichtes wurde ECF aus dem Überstand stimulierter Zellen auf eine Sephadex G 10-Säule aufgetragen (Abb. 12).

Wie erwartet eluierte die eosinophilotaktische Aktivität in Form eines breiten Gipfels im Bereich von Histamin. Die Schulter im ansteigenden Teil wurde in mehreren Experimenten gesehen, so daß die Frage ob es sich hier chemisch um eine einheitliche Substanz handelt, offen bleiben muß. Die Aktivität ist deutlich von dem Molekulargewichtsmarker Vitamin B₁₂ abgesetzt, der in der Nähe des Ausschlußvolumens (Dextranblau) eluiert.

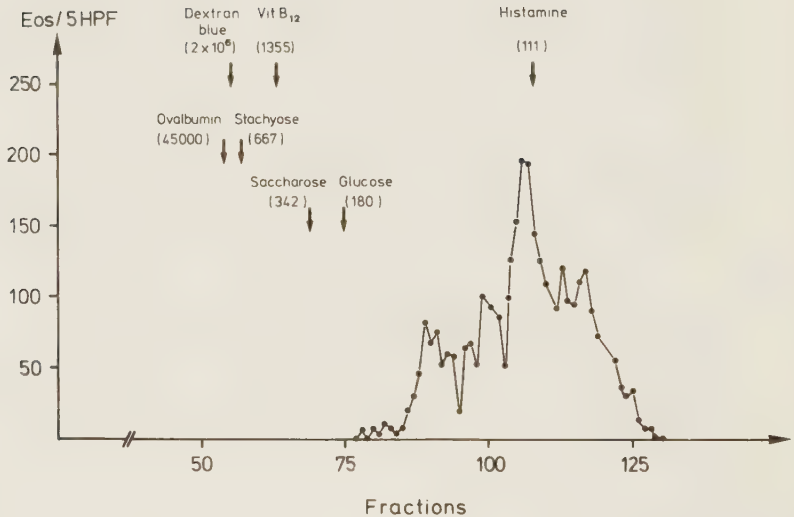


Abb. 12 : Gelfiltration eines Überstandes ionophorestimulierter Granulozyten über Sephadex G 10. Von den gesammelten Fraktionen wurden je 500 μ l in der Boyden-Kammer auf chemotaktische Aktivität gegenüber Meerschweinchen-Eosinophilen hin untersucht (ECF-I). Die Säule wurde mit Substanzen bekannten Molekulargewichts kalibriert, deren Elutionsmaxima durch Pfeile markiert sind.

Die im Vergleich zu Sephadex G 25 stärkere Trennung von Vitamin B₁₂ und Histamin läßt sich durch den besonderen Trennbereich von Sephadex G 10 (bis maximal 700 dalton) erklären. Es fällt jedoch auf, daß ECF sehr nahe an Histamin eluiert wird. Dies würde bedeuten, daß der Faktor nicht, wie früher angenommen, ähnlich wie ECF-A ein Molekulargewicht von 300 - 500, sondern eher 100 dalton hätte. Außerdem erscheinen ECF und Histamin erst auffallend spät im

Eluat; das Arbeitsvolumen der Säule ($V_t - V_p = V_o + V_i$) lag nämlich höchstens bei 140 - 155 ml (= Fraktion 100 - 115). Zur Kontrolle wurden daher andere, ungefärbte Molekulargewichtsmarker ausgetestet. Während Eieralbumin (MG 45 000) als Indikator für das Ausschlußvolumen ähnlich wie Dextranblau eluiert wird, erscheinen die verwendeten Zucker trotz ihres niedrigen Molekulargewichts wesentlich früher als Histamin und ECF (Stachyose vor Vitamin B₁₂!).

Die Bedeutung dieser verwirrenden Ergebnisse ist noch nicht geklärt. Es besteht aber Grund zu der Annahme, daß Vitamin B₁₂ und Histamin keine geeigneten Molekulargewichtsmarker für die Gelfiltration auf Sephadex darstellen, da "... eine Eichung mit Farbstoffen, die aromatische Reste enthalten, bei Gelfiltration nicht möglich ist, weil solche π -Elektronensysteme an Sephadex-Gelen verzögert werden" (persönliche Information, Dr. Duppel, Pharmacia, Freiburg). Wesentlich stärkere Verzögerungen wurden bei Versuchen mit Trypanblau, Eosin Y, Phenolphthalein und p-Nitrophenol beobachtet. Der Einsatz von Zuckern zur Kalibrierung der Säule ist allerdings ebenfalls nicht unproblematisch, da sich diese Substanzen anders verhalten als Peptide oder Lipide. Vor einer endgültigen Klärung der chemischen Struktur des ECF kann daher zur Zeit nur folgendes gesagt werden: Da der chemotaktische Faktor nahe der Position von Histamin eluiert, ist es möglich, daß auch er durch das Gel verzögert wird. Dies würde bedeuten, daß das ECF-Molekül aromatische Reste oder andere, mit Sephadex interagierende Strukturen (Fettsäuren?) enthält. Versuche zur genaueren physikochemischen Charakterisierung von ECF (128, 129) unterstützen solche Hypothesen.

1.2 Hypotone Lyse

ECF und Enzyme

Experimente, in denen intakte Zellen in hypotonen Medien lysiert wurden sind ursprünglich im Zusammenhang mit anderen, im Ab-

schnitt II.4 geschilderten Versuchen unternommen worden, um ECF oder Inaktivator von zellulären Strukturen abzuspalten. Dabei kam es zu folgenden unerwarteten Ergebnissen:

Abb. 13 zeigt die Auswertung des Überstandes menschlicher Granulozyten, die in schwach gepuffertem "Aqua dest." (0,7 mS, ~18 mOsmol/l) lysiert wurden. Es wird deutlich, daß nach einer Latenzzeit von 10-15 Minuten mehrere ECF-Maxima und -Minima nachzuweisen sind, mit Anstiegen auf Konzentrationen (fast 2000 Eos/5 HPF nach 55 Minuten!), die einem optimalen Stimulus mit Ionophore entsprechen. Zellen, die 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt wurden, zeigten eine längere Latenzzeit, niedrigere Höchstwerte und eine weniger deutlich nachweisbare Fluktuation der ECF-Konzentration im Zell-Überstand. Die Auswertung der abzentrifugierten Zellreste ergab eine geringe Eigenaktivität nach 20 Minuten (100 Eos/5 HPF) und eine verstärkte Inaktivierungspotenz nach 2-10 Minuten; diese Beobachtung muß jedoch noch exakter gesichert werden.

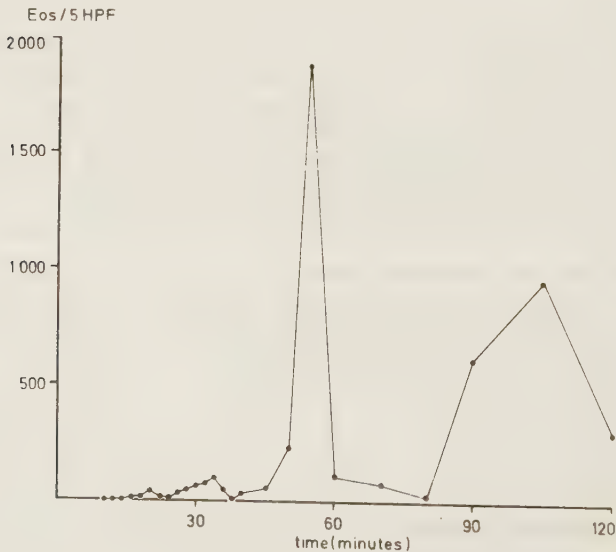


Abb. 13 : ECF-Freisetzung durch hypotone Lyse neutrophiler Granulozyten bei 37°C (Beschreibung siehe Material und Methoden, Abschnitt 3.2).

Eine Analyse der Enzyme (Abb. 14) zeigt, daß hier schon nach 2 bis 6 Minuten ein Maximum erreicht wird. Bis zu diesem Zeitpunkt werden freigesetzt: 100 % der Laktatdehydrogenase und sauren p-NP-Phosphatase, β -Glucuronidase) mit Ausnahme der Peroxidase (10 %), 15 - 30 % der alkalischen Phosphatase und alkalischen Phosphodiesterase sowie 10 % der ATPase. Erstaunlicherweise erscheinen 55 % des gesamten Zellproteins im Überstand (gemessen mit SDS!) aber keine DNA. Der Abfall der Enzyme zu späteren Zeitpunkten entspricht ihrer allmählichen Inaktivierung bei 37°C.

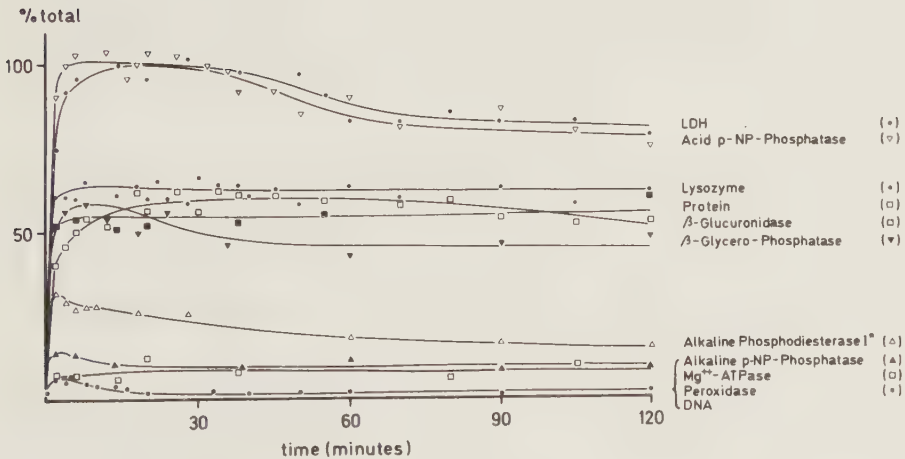


Abb. 14 : Enzymfreisetzung durch hypotone Lyse neutrophiler Granulozyten bei 37°C (vergleiche Abb. 13); der totale Enzymgehalt der Zellen entspricht einem Wert von 100 %.

Diese Daten lassen vermuten, daß der rein physikalische Vorgang, das Zerplatzen der Zellen durch osmotische Kräfte, sehr schnell innerhalb der ersten Sekunden oder Minuten geschieht. Unter dem Mikroskop ist manchmal zu beobachten, daß die Zellen innerhalb weniger Sekunden anschwellen und dann plötzlich wieder "zusammenschnurren".

Parallel zu den hier gezeigten Experimenten wurden neutrophile Granulozyten auch bei 0°C und in Gegenwart von EDTA (0,01 M, 2,1 mS, ~ 50 mOsmol/l) lysiert und zur Kontrolle sowohl einem isotonen (TCM-Puffer, 14 mS, ~ 300 mOsmol/l) wie auch hypotonem Medium (doppelt konzentrierter TCM-Puffer (27 mS, ~ 600 mOsmol/l) ausgesetzt. Trotz ähnlicher - nur leicht verzögerter - Enzymfreisetzung, konnte bei 0°C und in Gegenwart von EDTA kein ECF im Überstand nachgewiesen werden; in isotonem und hypertonem Medium erfolgte weder Enzym- noch ECF-Freisetzung.

Führt man die beschriebene Zell-Lyse in noch stärker hypotonem Medium (0,005 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,4 mS, ~ 9 mOsmol/l) durch (Abb. 15), so erscheint ECF ebenfalls erst nach einer Latenzperiode von etwa 10 Minuten. Die Fluktuation der Freisetzung ist aber in diesem Fall noch wesentlich stärker ausgeprägt (etwa 6-Minuten-Periodik bei 40 - 90 Minuten).

Die gleichen Experimente wurden mit Homogenaten und Zellfraktionen wiederholt, die, wie in Abschnitt III.2 beschrieben, durch Differentialzentrifugation gewonnen wurden. Die Eigenaktivität des Homogenates und der Zellfraktionen 1-4 änderten sich jedoch nicht durch Inkubation in Aqua dest. bis zu 90 Minuten. Die Verwendung ganzer Zellen scheint also Voraussetzung zur ECF-Generierung durch hypotone Lyse von Leukozyten zu sein.

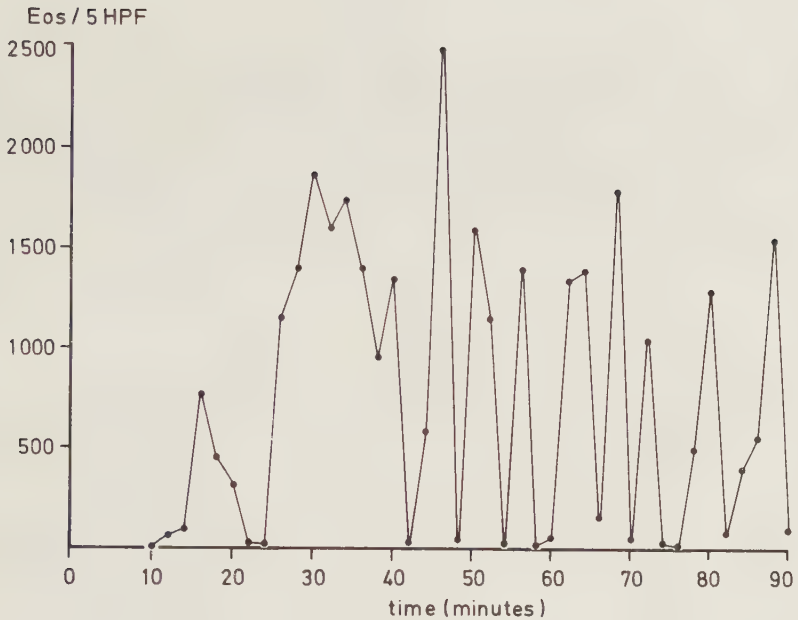


Abb. 15 : ECF-Freisetzung durch Lyse neutrophiler Granulozyten in stark hypotonem Medium (~ 9 mOsmol/l).

Das durch hypotone Lyse gewonnene, eosinophilotaktische Material ("ECF-lysis") wurde zur Kontrolle der Spezifität mit neutrophilen Granulozyten ausgetestet. Während Meerschweinchen-Neutrophile auf den Kontrollstimulus Casein (4-5 mg/ml) deutlich reagierten (700-800 Neutrophile/5 HPF), wanderten nur 5-15 der gleichen Zellen in Testansätzen mit ECF-Material, das 1000-2000 Eosinophile angelockt hatte. ECF-lysis ist also ebenso wie der Faktor, der durch Ionophore- oder Zx-Stimulation gewonnen wurde, fast ausschließlich chemotaktisch für eosinophile Leukozyten.

Gelfiltration

Die Resultate der Chromatographie des ECF-lysis auf Sephadex G 25 sind in Abb. 16 dargestellt. Aufgetragen wurden sowohl frühe

als auch späte Aktivitätsmaxima (siehe Experiment der Abb. 15). Es ergab sich, daß der mit dieser Methode gewonnene chemotaktische Faktor in den gleichen Fraktionen hinter dem Molekulargewichtsmarker Vitamin B₁₂ eluiert wie ECF aus dem Überstand ionophorestimulierter Granulozyten.

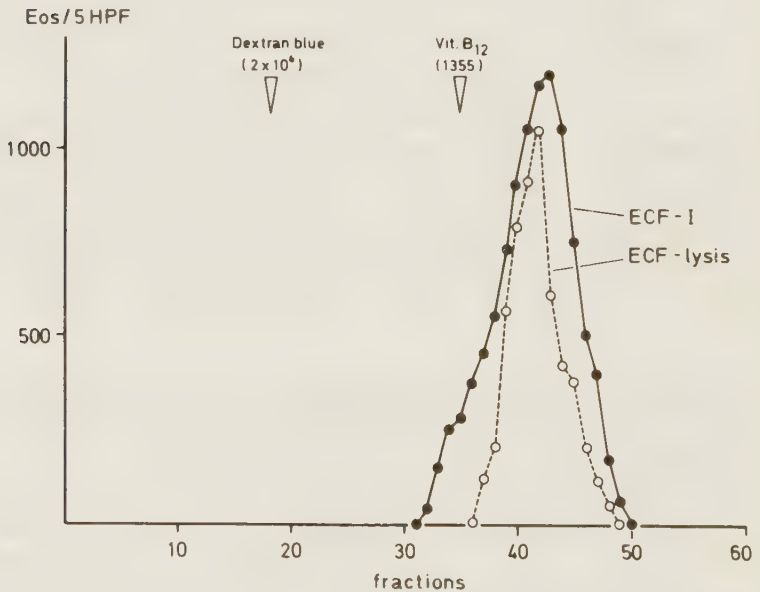


Abb. 16 : Vergleichende Gelfiltration von ECF aus dem Überstand von Granulozyten, die entweder mit Ionophore stimuliert (●—●) oder hypoton lysiert wurden (○---○) auf Sephadex G 25. Dextran blau und Vitamin B₁₂ dienten als Molekulargewichtsmarker.

Zusammenfassend zeigen die in diesem Abschnitt dargestellten Experimente wiederum eine Dissoziation von ECF- und Enzym-Freisetzung. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist daher dieser Faktor nicht in den osmotisch labilen Zellgranula gespeichert. Die Enzyme werden

mit der hier beschriebenen Methode vermutlich passiv durch osmotische Kräfte freigesetzt, während die ECF-Generierung eine gewisse Latenzzeit, Wärmeenergie, divalente Kationen und offensichtlich den gesamten Zellapparat oder zumindest eine Kombination bestimmter Struktureinheiten erfordert. Dies läßt an eine de novo-Synthese oder eine Abspaltung des Faktors von einer höhermolekularen Trägersubstanz denken.

2. Subfraktionierung der Granulozyten

2.1 Homogenisierung

Um subzelluläre Strukturen neutrophiler Granulozyten zu isolieren, mußten die Zellen zuerst homogenisiert werden. Die Schwierigkeit der Homogenisierung besteht darin, einerseits möglichst viele Zellen aufzuschließen, andererseits aber ihre Organellen möglichst unversehrt zu lassen. Jede Zellart verhält sich unterschiedlich während der Homogenisierung, und auch für Granulozyten sind in der Literatur mehrere Methoden mit spezifischen Vor- und Nachteilen beschrieben worden. Um die für unsere Zwecke beste Technik zu finden, wurden die Zellen jeweils so lange homogenisiert, bis nur noch etwa 5 - 20 % der Leukozyten unter dem Mikroskop intakt aussahen (Toluidinblau-Färbung). Eine 100 %ige Homogenisierung wurde nicht angestrebt, da in diesem Fall die Zellorganellen sehr schnell geschädigt werden, und außerdem der Zeitpunkt, die Homogenisierung zu stoppen, nur schwer zu standardisieren ist. Das fertige Zellhomogenat bestand somit aus mehr oder weniger aggregierten Zellkernen und Granula, unvollständig aufgeschlossenen sowie einigen intakten Zellen.

Der Wert der einzelnen Methode wurden danach eingestuft, wie schnell sie zu einer zufriedenstellenden Homogenisierung führte,

und wieviele Organellen danach noch als intakt zu bezeichnen waren. Die Unversehrtheit der subzellulären Strukturen läßt sich aufgrund von zwei Kriterien beurteilen:

1. Wieviele Enzyme liegen im Zellhomogenat noch "latent" vor, d.h. noch umgeben von einer intakten Membran? In diesem Fall sind sie für ihr Substrat erst nach Auflösung dieser Membran durch Detergentien wie Triton X-100, Digitonin oder Deoxycholat zugänglich.
2. Wie hoch ist der Prozentsatz der Enzyme, die noch abzentrifugierbar sind, wieviele sind also noch an hochmolekulare Strukturen gebunden?

Dieser letzte Parameter schien uns geeigneter, da mit ihm auch Enzyme erfaßt werden, die nicht latent aber membrangebunden vorliegen, wie z.B. viele mikrosomale Enzyme.

Tabelle 4 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen: Unter den getesteten Methoden waren die Homogenisierung durch Ultraschall (Sonication) und die Stickstoff-Cavitation (Nitrogen-Cavitation) am wirkungsvollsten; innerhalb der angegebenen Zeiten konnten 90 - 100 % der Leukozyten in fast jedem Medium homogenisiert werden. Der Zustand der Zellorganellen war jedoch vor allem nach Sonication unbefriedigend, da ein großer Teil gerade der mikrosomalen Enzyme (saure und alkalische p-NP-Phosphatase und ATPase) nicht mehr strukturgebunden vorlagen. Bessere Ergebnisse brachte der Teflon-Glas-Homogenisator nach Potter und Elvehjem. Hier waren die Resultate jedoch stark abhängig von den Homogenisierungsmedien: Zellen in isotoner Saccharose (0,34 M) und in elektrolythaltigen Medien waren kaum aufzubrechen. Der Zusatz von Heparin zur isotonen Saccharoselösung ermöglichte zwar eine schnelle Homogenisierung und sehr gute Gewinnung von Mikrosomen, hatte aber folgende Nachteile:

Homogenisierungs- Methode	Homogen. - Zeit	Homogen. - Grad (%)	% lösliche Aktivität (200 000 g-Überstand) % strukturgebundene Aktiv. ($P_2 + P_3 + P_4$)				
			Peroxid.	Lysozym β -Glucur.	saure + Phosph.	alkal. + Phosph.	Mg-ATPase
1. Sonication Saccharose 0, 34 M	(Sekunden) 15-30	90-100	$\frac{30}{70}$	$\frac{80}{20}$	$\frac{85}{15}$	$\frac{95}{5}$	$\frac{90}{10}$
2. Teflon-Glas-H. a) Tris-NaCl, 0, 2% → Tris-NaCl, 1, 6%	(Hübe) 50-100	40-70	$\frac{16}{84}$	$\frac{73}{27}$	$\frac{63}{37}$	$\frac{85}{15}$	$\frac{80}{20}$
b) Sacch., 0, 1 M → Sacch., 0, 58 M	40-80	80-95	$\frac{2}{98}$	$\frac{2}{98}$	$\frac{9}{91}$	$\frac{37}{63}$	$\frac{11}{89}$
c) Sacch. -Heparin 0, 34 M - 50 U/ml	10-30	90-100	$\frac{16}{84}$	$\frac{14}{86}$	$\frac{21}{79}$	$\frac{22}{78}$	$\frac{4}{96}$
3. Stickstoff-Cavit. Saccharose 0, 34 M	(Min./60 atü) 30	90-100	$\frac{7}{93}$	$\frac{3}{97}$	$\frac{18}{82}$	$\frac{42}{58}$	$\frac{52}{48}$

Tabelle 4 :

Vergleich von Methoden zur Homogenisierung menschlicher Granulozyten.

Die Leukozyten wurden mit der jeweiligen Technik über die angegebene Zeit homogenisiert. Danach mußten intakte Zellen (P_1) abzentrifugiert werden, um die Auswirkungen eines unterschiedlichen Homogenisierungsgrades auszuschließen. Der postnukleäre Überstand (=100%) wurde dann nach dem beschriebenen Schema differentialzentrifugiert und der Enzymgehalt der abzentrifugierten Strukturen ($P_2 + P_3 + P_4$) dem des löslichen Überstandes (200 000 g-Überstand) gegenübergestellt.

(Bei den Phosphatasen⁺ handelt es sich um die p-Nitrophenyl-Phosphatasen. Die jeweils besten Resultate sind hervorgehoben.)

Heparin hemmt viele Enzyme und greift damit unkontrollierbar in den Zellstoffwechsel ein (1, 86), es erhöht schlagartig die Viskosität der Zellsuspension (27) und erschwert dadurch die Trennung der Organellen. Außerdem führt Heparin zu einer Zerstörung der Zellkerne: Mehr als 80% der DNA waren im löslichen 200 000 g - Überstand des Homogenats nachweisbar, und unter dem Mikroskop sah man nur wenige intakte Kerne vor einem diffus blauen Hintergrund (freie DNA); somit aber lassen sich Kerne und postnukleärer Überstand nicht oder nur schwer voneinander trennen. Die gesteigerte Viskosität der Lösung läßt sich zwar durch Erhöhung der Heparinkonzentration vermindern (27), dies aber verstärkt wiederum die Hemmung von Enzymen.

Umgehen läßt sich dieses Problem durch die Verwendung von stark hypotoner Saccharose (0,1 M) während der Homogenisierung. Die Zellen schwellen an und sind dann so labil, daß - abhängig von der Clearance des Homogenisators - nach 40 - 80 Auf- und Abbewegungen beinahe alle Leukozyten aufgebrochen sind: Durch Zugabe des gleichen Volumens an hypertoner Saccharose (0,58 M) läßt sich die Lösung wieder isotonisieren, um ein Platzen der freigesetzten Zellstrukturen zu verhindern.

Mit dieser Methode lassen sich menschliche Granulozyten schnell und relativ schonend homogenisieren: Mehr als 90% der DNA und ein hoher Prozentsatz der granulären (Peroxidase, Lysozym, β -Glucuronidase) und mikrosomalen Enzyme (saure und alkalische Phosphatase, Mg-ATPase) bleiben strukturgebunden (Tab. 4). Alle in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden unter Verwendung dieser Technik gewonnen; ähnliche Ergebnisse konnten aber in Vorversuchen auch mit dem Zusatz von Heparin (50 U/ml) erzielt werden.

2.2 Trennung subzellulärer Struktureinheiten

Das Homogenat wurde zur ersten, groben Orientierung mit Hilfe der Differentialzentrifugation und zur genaueren Analyse durch Isopyknische Dichtegradientenzentrifugation in seine Bestandteile zerlegt.

2.2.1 Differentialzentrifugation

Mit 4 Zentrifugationsschritten wurde das Homogenat in 5 Fraktionen unterteilt (siehe Material und Methoden). Die Austestung der sonierten Zellfraktionen in der Boyden-Kammer ergab folgendes Bild (Abb. 17):

Im Gegensatz zu einem vollständigen Homogenat, in dem keine oder nur geringe chemotaktische Aktivität nachweisbar ist, zeigen die Fraktionen 1 (400 g-Sediment), 4 (200 000 g-Sediment) und 5 (200 000 g-Überstand) unstimulierter Granulozyten (a) eine deutliche ECF-Aktivität. Diese Aktivität ist 3-5-fach höher nach Fraktionierung Ionophore- oder Zx-stimulierter Zellen (b). Wird nun zu den isolierten Zellfraktionen ECF bekannter Aktivität hinzugegeben, so inaktivieren die Fraktionen 2 (3000 g-Sediment) und 3 (20 000 g-Sediment) diesen ECF um etwa 50%, während die Fraktionen 1, 4 und 5 zu einer starken Überhöhung der Standard-ECF-Aktivität führen. Diese verstärkte Chemotaxis ist nur teilweise durch die Eigenaktivität der Fraktionen 1, 4 und 5 zu erklären, da sie über eine reine Addition weit hinausgeht.

Zur Charakterisierung der 5 Fraktionen wurden nun die Leitenzyme bestimmter subzellulärer Strukturen gemessen. Zwischen unstimulierten und stimulierten Leukozyten bestanden nur Unterschiede bezüglich der Granula-Enzyme: Vor allem die Konzentrationen von Lysozym und β -Glycero-Phosphatase waren in stimulierten Zellen deutlich niedriger als in unstimulierten Granulozyten; das Vertei-

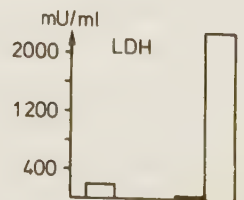
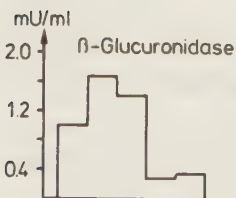
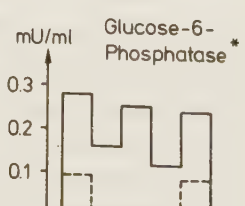
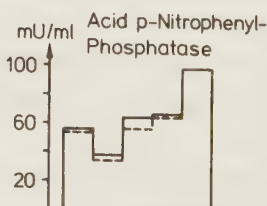
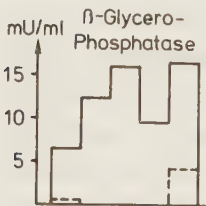
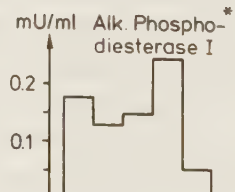
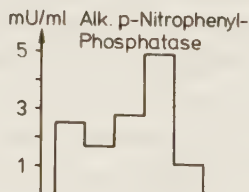
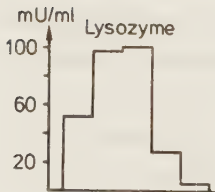
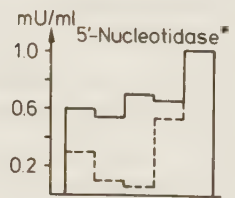
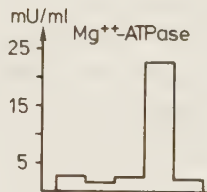
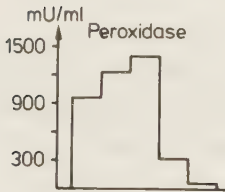
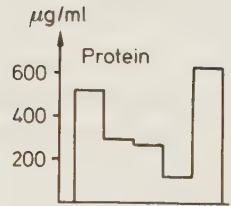
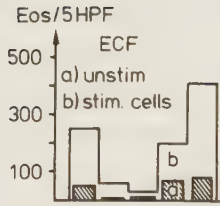
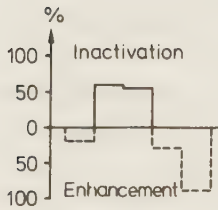


Abb. 17 : Differentialzentrifugation von Homogenaten neutrophiler Granulozyten. (Mit Ausnahme der ECF-Aktivität bestanden kaum Unterschiede zwischen unstimulierten (a) und stimulierten Zellen (b); siehe Text.)

In den Histogrammen sind auf der Abszisse von links nach rechts die 5 Fraktionen aufgetragen (1 = 400 g-Sediment, 2 = 3000 g-Sediment, 3 = 20 000 g-Sediment, 4 = 200 000 g-Sediment, 5 = 200 000 g-Überstand).

Die Ordinate zeigt die jeweils gemessenen Aktivitäten der einzelnen Fraktionen:

Spalte 1: Inaktivierung ("Inactivation") bzw. Verstärkung ("Enhancement") der Aktivität von zugegebenem ECF; darunter die Granulamarker Peroxidase, Lysozym, β -Glycero-Phosphatase und β -Glucuronidase.

Spalte 2: ECF-Aktivität von Fraktionen unstimulierter (a) und stimulierter Granulozyten (b); darunter die Mikrosomenmarker Mg-ATPase, alkalische und saure Phosphatase.

Spalte 3: Proteingehalt, drei mit * markierte, nicht sicher identifizierbare Enzyme (siehe Text) und unten der Zytoplasmamarker Laktatdehydrogenase.

(Die unterbrochenen Linien zeigen den nicht durch Natriumtartrat hemmbaren Anteil der sauren und neutralen Phosphatasen.)

Die Daten entsprechen Mittelwerten aus 8 getrennten Experimenten. Die Variationskoeffizienten (Standardabweichungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet) lagen zwischen 11 und 38%.

lungsmuster änderte sich damit jedoch nur wenig. Bei nicht granulären Enzymen waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

Aus der ersten Spalte der Abb. 17 wird deutlich, daß die inaktivierenden Fraktionen 2 und 3 den größten Teil der Granulamarker Peroxidase, Lysozym, β -Glycero-Phosphatase und β -Glucuronidase enthalten; der Inaktivator scheint also zusammen mit den Granula der Zellen zu sedimentieren. Die im Vergleich zu den anderen Enzymen hohe Aktivität der β -Glycero-Phosphatase in Fraktion 5 ist teilweise dadurch zu erklären, daß hier eine nicht durch Natriumtartrat hemmbare Phosphatase (evtl. die rechts daneben eingezeichnete saure p-NP-Phosphatase) das Substrat des granulären Enzyms umsetzt. Andererseits fiel auf, daß die β -Glycero-Phosphatase sehr leicht von der Granulamatrix abgespalten wird, so daß sie im Fall zu starker Homogenisierung zu einem hohen Prozentsatz im löslichen Zellüberstand gewonnen wird.

Die ECF-haltige Fraktion 1 besteht aus intakten oder unvollständig homogenisierten Zellen und Zellkernen, während die Fraktion 4 nur wenig Protein, aber den größten Anteil der Mikrosomenmarker Mg-ATPase und alkalischen Phosphatase enthält. Der größere Teil der sauren p-NP-Phosphatase erscheint in Fraktion 5, die das Zytoplasma der Zellen (Laktatdehydrogenase) sowie alle löslichen und infolge Homogenisierung gelösten Zellbestandteile enthält.

Die bei der Leber etablierten Mikrosomenmarker 5'-Nukleotidase, Glukose-6-Phosphatase und alkalische Phosphodiesterase I (10) erwiesen sich für die Arbeit mit menschlichen Granulozyten als ungeeignet: Ihre Aktivität war nur sehr niedrig, und die starke Hemmbarkeit der beiden Phosphatasen durch Tartrat legt die Vermutung nahe, daß die Substrate unspezifisch von anderen Phosphatasen hydrolysiert wurden. Mit Ausnahme der Phosphodiesterase, die bei der Dichtegradientenzentrifugation ein von den anderen Enzymen abweichendes Verteilungsmuster ergab, werden sie daher im folgenden nicht mehr aufgeführt.

Die Resultate der Differentialzentrifugation werden übersichtlicher, wenn sie in Form der Relativen Spezifischen Aktivitäten ($RSA = \% \text{ Aktivität} / \% \text{ Protein}$) gegen den Proteingehalt jeder Fraktion aufgetragen werden (Abb. 18). Diese Darstellung verdeutlicht Anreicherung ($RSA > 1$) bzw. Verluste ($RSA < 1$) von Substanzen in bestimmten Fraktionen, da das nicht aufgetrennte Homogenat einen RSA-Wert von 1 hat. Gleichzeitig gibt die Fläche unter der Kurve die Absolutmenge dieser Substanz in der jeweiligen Fraktion an (41).

Diese Umrechnung ist mit Enzymen ohne weiteres möglich. Mit ECF und Inaktivator ist das ganze jedoch nur mit Vorsicht zu bewerten, da die Gesamtmenge an ECF pro Zelle nicht zu bestimmen ist (der Faktor ist nicht präformiert!) und die Chemotaxis fördernde und hemmende Faktoren nebeneinander in der Zelle vorkommen und sich daher gegenseitig beeinflussen. Die Abbildung zeigt jedoch, daß die Position des Inaktivators (Fraktionen 2 und 3) mit Zellfraktionen korreliert, die durch eine 2-3-fach höhere Konzentration granulaspezifischer Enzyme (Peroxidase, Lysozym, β -Glycero-Phosphatase, β -Glucuronidase) im Vergleich zum Homogenat charakterisiert sind. Im Gegensatz dazu ist die ECF-Konzentration in der Fraktion 4 am höchsten; sie enthält nur etwa 7% des Zellproteins, dafür aber 3-10-fach angereinigte Mikrosomenmarker (Mg-ATPase, alkalische und saure Phosphatase, alkalische Phosphodiesterase I). Das zytoplasmatische Glykolyseenzym LDH ist wie zu erwarten im Zellüberstand konzentriert.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß nach subzellulärer Fraktionierung ECF in der "Kernfraktion" (Fraktion 1) und im löslichen Überstand (Fraktion 5), am höchsten konzentriert jedoch in der Mikrosomenfraktion (Fraktion 4) gefunden wird. Die Granula-Fraktionen der Granulozyten (Fraktion 2 und 3) enthalten dagegen Material, das diesen chemotaktischen Faktor inaktivieren kann ("Inaktivator").

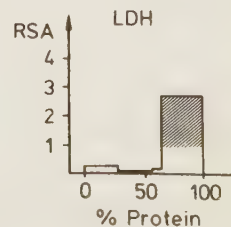
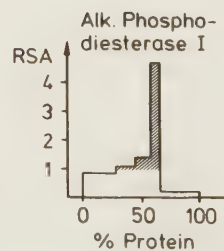
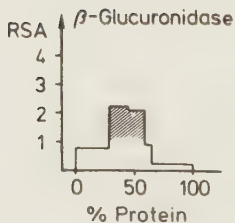
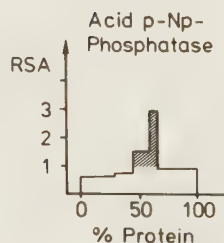
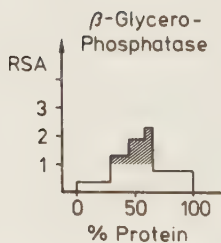
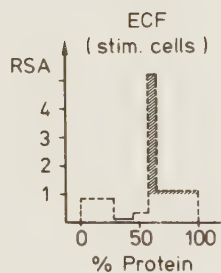
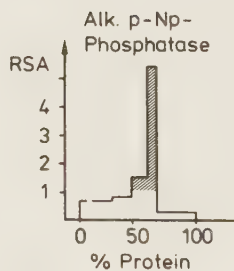
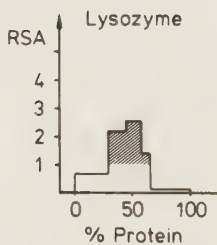
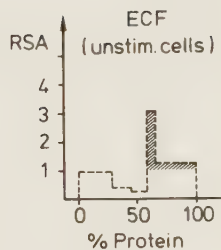
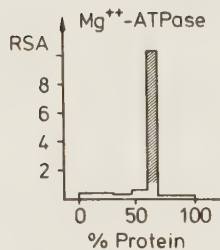
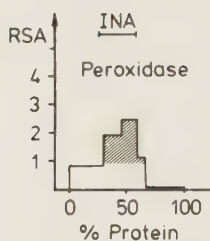


Abb. 18: Der Abbildung liegen die gleichen Daten wie Abb. 17 zugrunde, nur die Darstellung wurde geändert: Die Abszisse gibt hier den prozentualen Proteinanteil jeder der 5 Fraktionen am Proteingehalt des Homogenates an. Auf der Ordinate ist die Relative Aktivität (RSA) angegeben, die aus folgendem Quotienten errechnet wird: Prozentsatz der Aktivität einer Fraktion an der Gesamtaktivität / Prozentsatz des Proteingehalts dieser Fraktion an dem gesamten Proteingehalt des nicht aufgetrennten Homogenates.

Die schraffierten Areale ($RSA > 1$) zeigen die Anreicherung des Materials und damit eine Konzentrierung der betreffenden Organellen in bestimmten Fraktionen an. Aus den im Text näher erläuterten Gründen sind die mit Vorbehalt zu beurteilenden Auswirkungen der Zellfraktionen auf die Chemotaxis gesondert dargestellt (ECF als unterbrochene Linie, inaktivierendes Material (INA) nur als der Bereich mit der stärksten Aktivität in Abbildung 17).

2.2.2 Dichtegradientenzentrifugation

Zur genaueren Charakterisierung der ECF- und inaktivatorhaltigen Zellstrukturen wurden die Zellen nach Homogenisierung auf einem Dichtegradienten in ihre Bestandteile zerlegt. In 12 getrennten Experimenten wurden etwa 40 Gradienten (zum großen Teil im Duplikat) unterschiedlichen Volumens und Aufbaus zentrifugiert. Das aufzutrennende Zellmaterial war entweder ein resuspendiertes Sediment aus den Differentialzentrifugationsexperimenten, oder ein postnukleärer oder postgranulärer Überstand. Aus der Arbeit mit Dichtegradienten ergaben sich folgende allgemeine Regeln:

- Vor allem zur Trennung der PMN-Granula ist ein nicht abzentrifugiertes Präparat, d.h. ein postnukleärer Überstand geeigneter als ein resuspendiertes Sediment, da im letzteren Fall eine starke Agglutination der Zellorganellen oft nicht zu vermeiden ist.
- Kontinuierliche Gradienten trennen besser auf als Stufengradienten mit großen Konzentrationssprüngen (Agglutination an den Phasengrenzen).
- Suspension von Zellpartikeln in hoch konzentrierte Saccharose-lösung zur Adaptation an Gradienten hoher Dichte bewährte sich nicht. Geeigneter erschien uns ein Auftragen des Materials in isotoner Saccharose auf einen steilen, aber kontinuierlichen (!) Anschlußgradienten (siehe Abb. 21).

Die in dieser Arbeit gezeigten Gradienten sind repräsentativ für mindestens 4 Gradienten unter ähnlichen Bedingungen. Eine statistische Auswertung war ohne Hilfe eines Computerprogramms (97) nur schwer möglich, da geringe Unterschiede (Fraktionszahl, Steigung des Gradienten ...) nicht zu vermeiden waren.

In dem Experiment der Abbildung 19 wurde ein postnukleärer Überstand unstimulierter Granulozyten auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetragen, dessen Konzentrationsbereich die Dichte aller interessierenden subzellulären Strukturen umfaßt. Nach der Zentrifugation wurden 21 Fraktionen gewonnen, auf gleiche Saccharosekonzentration gebracht und ausgetestet.

Das Protein ist in seinem Hauptteil nicht in den Gradienten eingewandert. Es handelt sich hierbei um lösliche Substanzen, die aufgrund ihrer geringen Masse nur sehr langsam sedimentieren (Fraktionen 18 - 21). Im Gradienten sind schon makroskopisch 2 Hauptbanden zu identifizieren: eine schmale Zone in einem Dichtebereich von $1,12 - 1,15 \text{ g/cm}^3$ (M) und eine weitere, breite Bande in einem Bereich von $1,17 - 1,24 \text{ g/cm}^3$ (A, B, C). Eine schwach eosinophilotaktische (unstimulierte Zellen!) und ECF-potenzierende Aktivität korreliert mit der weniger dichten Bande (M), während die Position des ECF-Inaktivators (40% Inaktivierung) etwa mit der Mitte der dichteren Proteinbande (B) übereinstimmt.

Eine Analyse der dazu gehörenden Enzymaktivitäten ergibt, daß im Bereich der M-Bande mikrosomale Enzyme wie saure p-NP-Phosphatase, alkalische p-NP-Phosphatase, Mg-ATPase und Teile der alkalischen Phosphodiesterase I äquilibrieren. Die granulären Enzyme sind in der dichteren Zone zu finden: Lysozym und β -Glycero-Phosphatase mit einem Doppelgipfel bei $1,23 \text{ g/cm}^3$ (A) und $1,195 \text{ g/cm}^3$ (C), Peroxidase und β -Glucuronidase zwischen beiden bei $1,21 \text{ g/cm}^3$ (B), mit einer angedeuteten Schulter auf der dichteren Seite. Auffällig ist das von den anderen Enzymen abweichende Verteilungsmuster der alkalischen Phosphodiesterase I und der schon bei der Differentialzentrifugation aufgefallene, hohe lösliche Anteil der β -Glycero-Phosphatase. Letzteres läßt sich durch eine im Vergleich z.B. zur Peroxidase lokkere Bindung dieses Enzyms und durch eine Überlagerung der (nicht durch Tartrat hemmbaren) p-NP-Phosphatase erklären.

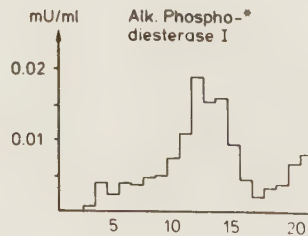
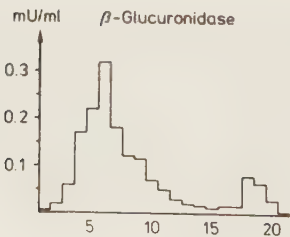
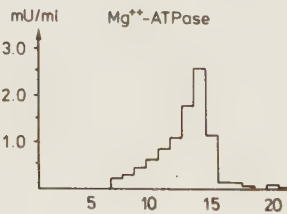
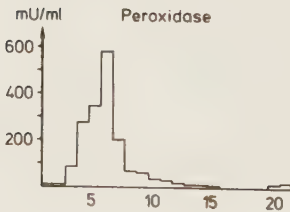
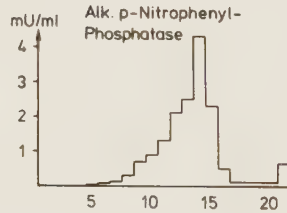
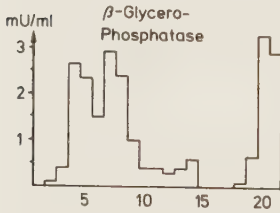
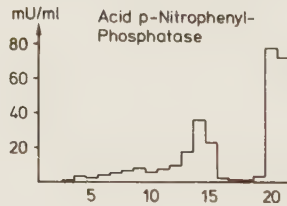
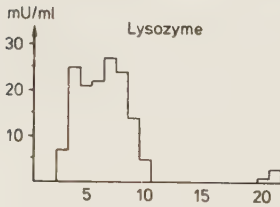
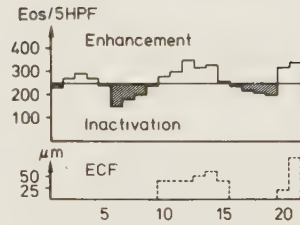
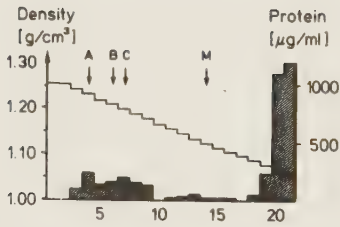


Abb. 19 : Isopyknische Dichtegradientenzentrifugation eines post-nukleären Überstandes menschlicher Granulozyten.
(Aufgetragenes Zellmaterial: 5 mg Protein in 2 ml Saccharoselösung, 0,34 M; kontinuierlicher Gradient: 36 ml, 19 - 54 % (w/w) Saccharose; Rotor: SW 27; Zentrifugation: 10 Stunden bei 100 000 g, Bezugspunkt: Spitze der Polycarbonat-Röhrchen.)
Der Auftragspunkt liegt am rechten Ende der Histogramme, das Material sedimentierte also von Fraktion 21 bis 1 in den Gradienten, dessen Dichte von 1,06 bis 1,25 g/cm³ anstieg (zusammen mit der Proteinverteilung links oben angegeben). Die Austestung der Fraktionen in der Boyden-Kammer ist oben rechts dargestellt: "ECF" = geringe eosinophilotaktische Eigenaktivität der isolierten Zellstrukturen (um = Distanz der "leading front" im Filter); darüber: Fähigkeit der Fraktionen, zugegebenen ECF (Aktivität: 250 Eos/5 HPF) zu inaktivieren ("Inactivation") oder seine Aktivität zu verstärken ("Enhancement"). Die darunter liegenden Histogramme zeigen das Verteilungsmuster granulärer (links) und mikrosomaler Enzyme (rechts). Die Weitere Beschreibung der Ergebnisse findet sich im Text.

In Übereinstimmung mit den Daten der Differentialzentrifugation sedimentiert also ECF zusammen mit mikrosomalen Bestandteilen und der Inaktivator mit granulären, peroxidasepositiven Strukturen.

In den darauf folgenden Experimenten wurde die in einem postgranulären Überstand ionophorestimulierter Granulozyten enthaltene Mikrosomenfraktion auf einen flachen Gradienten niedriger Dichte aufgetragen, um die M-Bande (Abb. 19) genauer zu untersuchen (Abb. 20).

Strukturen mit ECF-Aktivität äquilibrieren hier mit einem Maximum bei $1,13 \text{ g/cm}^3$ (M_1) und einem zweiten kleineren Gipfel bei $1,17 \text{ g/cm}^3$ (M_2). Dieses Verteilungsmuster ähnelt dem der sauren p-NP-Phosphatase, alkalischen p-NP-Phosphatase und Mg-ATPase, während nur ein Gipfel der alkalischen Phosphodiesterase I der Position des ECF-Maximums entspricht. In dem gleichen Experiment sind die Leukozyten mit der ^{125}I -Jod-Laktoperoxidase-Methode behandelt worden. Mit dieser Technik wird die Zelloberfläche radioaktiv markiert, indem vor allem Tyrosin- und Histidinreste der Plasmamembran jodiert werden. Es ist jedoch bekannt, daß auch intrazelluläre Strukturen mit markiert werden. Nach unserer Erfahrung werden im Fall neutrophiler Granulozyten sogar bevorzugt die azurophilen Granula jodiert, was wohl auf deren hohen Gehalt an Peroxidase zurückzuführen ist. Da in unserem Experiment jedoch der größte Teil der peroxidasepositiven Granula vorher abzentrifugiert worden war ("postgranulärer Überstand"), repräsentieren die jodierten Strukturen wahrscheinlich Zellmembranen. Da außerdem die Mg-ATPase ein sicherer Plasmamembranmarker zu sein scheint (49), unterstreichen diese Daten die Vermutung, daß ECF aus mikrosomalen Strukturen und wahrscheinlich sogar direkt aus der Plasmamembran stammt.

Zur genaueren Analyse der inaktivierenden Granulafraktionen wurde ein postnukleärer Überstand homogenisierter Leukozyten auf einen flachen Gradienten hoher Dichte aufgetragen, der die verschiedenen

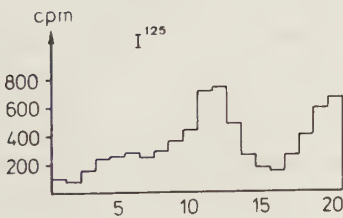
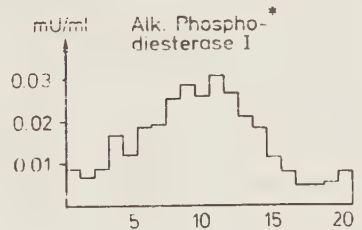
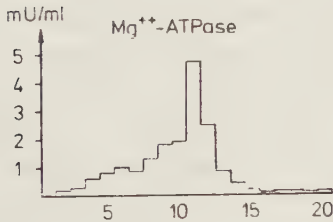
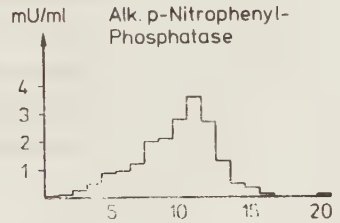
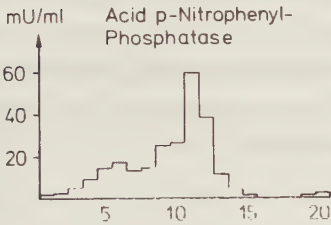
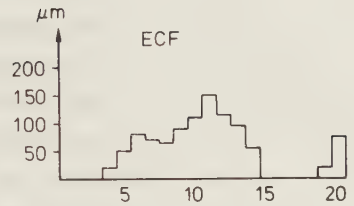
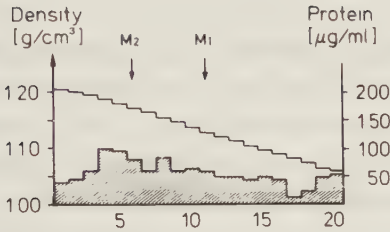


Abb. 20 : Isopyknische Dichtegradientenzentrifugation eines postgranulären Überstandes ionophorestimulierter Granulozyten.

(Aufgetragenes Zellmaterial: 1,6 mg Protein in 2 ml Saccharoselösung, 0,34 M; kontinuierlicher Gradient: 36 ml, 19 - 45 % (w/w) Saccharose; Rotor: SW 27; Zentrifugation: 10 Stunden bei 100 000 g, Bezugspunkt: Spitze der Polycarbonatröhrchen.)

Die Ergebnisse sind wie in Abb. 19 dargestellt. Neu ist nur das Histogramm links unten, in dem die Radioaktivität (counts per minute) von Zellfraktionen neutrophiler Granulozyten angegeben ist, deren Oberfläche mit der ¹²⁵Jod-Laktoperoxidase-Methode markiert worden war (siehe Text).

Granulatypen weiter auftrennen sollte. Auf dem eigentlichen Gradienten wurde ein kleiner, kontinuierlicher Anschlußgradient aufgebaut, um das Zellmaterial ohne starke Konzentrationssprünge in isotoner Saccharose auflegen zu können. Nach Zentrifugation im SW 40-Rotor ergab sich folgendes Bild (Abb. 21):

Die Fraktion mit der höchsten inaktivierenden Potenz (78% Inaktivierung) hat eine Dichte von $1,21 \text{ g/cm}^3$ (B_1). Dies entspricht einem Maximum Peroxidase- und β -Glucuronidase-positiver Granula, die in diesem Experiment aus 2 Subpopulationen zu bestehen scheinen ($B_1 : 1,21 \text{ g/cm}^3$, $B_2 : 1,22 \text{ g/cm}^3$). Diese Aufspaltung der peroxidasepositiven Granula war nicht immer so deutlich wie hier dargestellt. In anderen Versuchen war nur ein Hauptgipfel bei $1,21 \text{ g/cm}^3$ mit einer deutlichen Schulter an der dichteren Flanke nachzuweisen. Die Enzyme Lysozym und β -Glycero-Phosphatase äquilibrieren wie erwartet in Form von 2 getrennten Banden bei $1,23 \text{ g/cm}^3$ (A) und etwa $1,19 \text{ g/cm}^3$ (C). Die weniger dichte Granulapopulation (C) fällt hier mit dem Anteil der löslichen Enzyme zusammen (Fraktionen 15, 16, 17), die in diesem Experiment leider einen großen Teil der Gesamtaktivität stellen, da etwas zu lange homogenisiert worden war; außerdem äquilibrieren in diesem Bereich des Gradienten auch die ebenfalls im Startmaterial enthaltenen Mikrosomen. In Übereinstimmung mit früheren Daten ist offenbar - im Gegensatz z.B. zur Peroxidase - die β -Glycero-Phosphatase nur in geringem Maße strukturegebunden. Dies erklärt die im Vergleich zum Auftragspunkt nur geringe Aktivität in den Fraktionen A und C. Daneben spielt aber auch die Überlagerung der sauren p-NP-Phosphatase eine Rolle, da dieses Enzym ebenfalls in der Lage ist, β -Glycero-Phosphatase zu hydrolysieren.

Wie schon im Zusammenhang mit der Differentialzentrifugation erwähnt, führt die Kombination der Fraktionen niedriger Dichte und löslicher Faktoren (Fraktionen 15, 16, 17) mit Standard-ECF zu einer

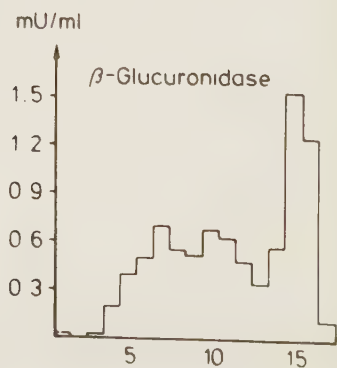
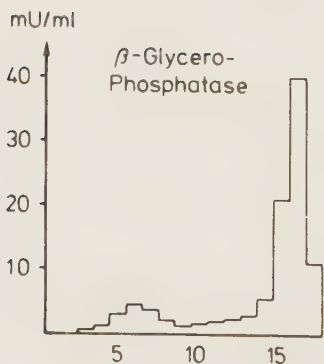
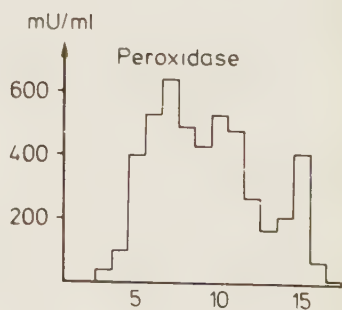
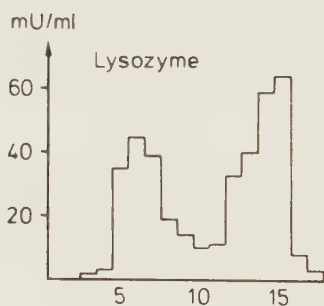
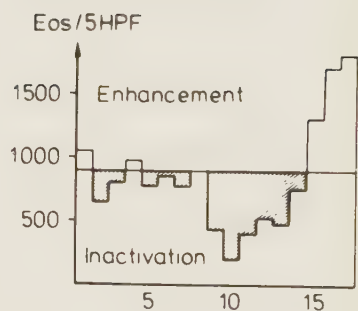
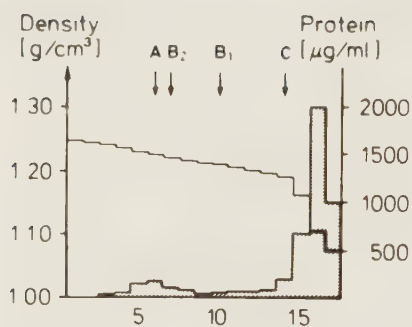


Abb. 21 : Isopyknische Dichtegradientenzentrifugation eines postnukleären Überstandes menschlicher Granulozyten.

(Aufgetragenes Zellmaterial: 2,5 mg Protein in 1 ml Saccharoselösung, 0,34 M; Gradient: ein kontinuierlicher Gradient von 11 ml, 43 - 53 % (w/w) Saccharose, darauf ein kontinuierlicher Anschlußgradient von 1,7 ml, 15 - 39 % (w/w) Saccharose; Rotor: SW 40; Zentrifugation: 11 Stunden bei 100 000 g, Bezugspunkt: Spitze der Polycarbonatröhrchen.)

Die Ergebnisse sind wie in Abb. 19 dargestellt. Aufgrund des besonderen Aufbaus des Gradienten fallen hier am Auftragungspunkt (Fraktionen 15, 16, 17) die weniger dichten Granula (C) mit Mikrosomen und löslichem Material zusammen.

deutlichen Verstärkung der Chemotaxis, die weit über eine additive Wirkung hinausgeht. Diese Beobachtung wird zur Zeit noch genauer untersucht.

In Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen (125, 147, 148) zeigen diese Experimente, daß die Granula von menschlichen neutrophilen Granulozyten aus mindestens 3 Untergruppen unterschiedlicher Dichte bestehen. Wahrscheinlich sind außerdem 2 Subpopulationen der peroxidasepositiven Granula zu fordern, wobei in deren weniger dichtem Anteil Material lokalisiert ist, das ECF inaktivieren kann ("Inaktivator").

2.3 Gelchromatographie

Zellfraktionen mit ECF-Aktivität

Zur Klärung des Molekulargewichts wurden die chemotaktisch aktiven Zellfraktionen 4 und 5 (200 000 g-Sediment und 200 000 g-Überstand) aus den Differentialzentrifugationsexperimenten auf eine kleine Sephadex G 25-Säule aufgetragen. Ihre Elution wurde mit einem Standard-ECF aus dem Überstand intakter, ionophorestimulierter Granulozyten verglichen.

Abb. 22 zeigt, daß der Standard-ECF wie erwartet zwischen den Molekulargewichtsmarkern Vitamin B₁₂ und Histamin eluiert. Die chemotaktische Aktivität der Fraktion 5 eluiert an der gleichen Position, während ein Teil der Aktivität von Fraktion 4 auch im Ausflußvolumen der Säule (Dextran blau) erscheint. Die Aktivität der Mikrosomenfraktion 4 ist sehr niedrig (Messung nach der "leading front"-Methode), konnte aber mehrfach in der gleichen Verteilung nachgewiesen werden. Die chemotaktische Wirkung des Materials auf neutrophile Granulozyten war nur minimal im Vergleich zu eosinophilen Zellen (maximal 10 Neutrophile / 5 HPF); sie konnte nur in

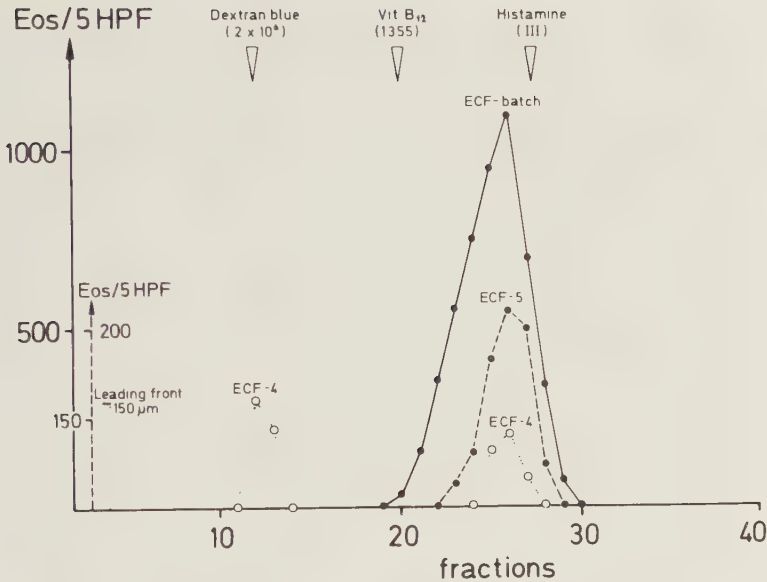


Abb. 22 :

Vergleichende Gelfiltration von ECF-haltigem Material: Überstand intakter, ionophorestimulierter Granulozyten (ECF-batch: ●—●); 200 000 g-Überstand (ECF-5: ●----●) und 200 000 g-Sediment (ECF-4: o.....o) eines Homogenates ionophorestimulierter Zellen. Messung der chemotaktischen Aktivität entweder nach der "Zähl-Methode" (Eos/5 HPF) oder nach der "leading front-Methode" (Distanz der führenden Zellen vom Startpunkt aus in µm). Dextran blau, Vitamin B₁₂ und Histamin dienten als Molekulargewichtsmarker.

Fractionen mit sehr hoher eosinophilotaktischer Aktivität und angedeutet auch im Ausschlußvolumen der Säule gezeigt werden.

Das chromatographische Verhalten der Zellfraktionen unterstreicht, daß die chemotaktische Aktivität in Fraktion 5 dem löslichen, niedermolekularen ECF aus den Überständen intakter, stimulierter Granulozyten entspricht. Im Gegensatz dazu scheint der Faktor in Fraktion 4 (Mikrosomen-Fraktion) an einen hochmolekularen Träger gebunden vorzuliegen: Er ist abzentrifugierbar und erscheint bei der Chromatographie neben der erwarteten Position im niedermolekularen Bereich auch im Ausschlußvolumen der Säule. In der Boyden-Kammer wird wahrscheinlich nur der lösliche, niedermolekulare Anteil nachgewiesen, weil nur lösliche Substanzen einen chemotaktischen Gradienten aufbauen können. Als Ursache für die Tatsache, daß ECF in der partikulären Zellfraktion 4 nachgewiesen werden kann, muß man wohl eine dauernde, geringe Spontanfreisetzung aus mikrosomalen Strukturen der neutrophilen Granulozyten annehmen.

Zellfraktionen mit Inaktivator-Aktivität

Da aus vorausgegangenen Untersuchungen (37) bekannt war, daß der Inaktivator der Granulozyten bei der Gelchromatographie im hochmolekularen Bereich eluierte, wurden die inaktivierenden, granulären Zellfraktionen 2 und 3 (3000- und 20 000 g-Sediment) nach Sonication auf eine Sephadex G 200 - Säule aufgetragen.

Abbildung 23 zeigt, daß der Hauptanteil des inaktivierenden Materials in einem breiten Molekulargewichtsbereich unter ungefähr 50 000 dalton, mit geringer Aktivität aber auch im Ausschlußvolumen der Säule, eluiert. Die Homogenisierung der Granula durch Ultraschall (Sonication) bewirkt eine unspezifische Zerkleinerung des Materials. Das Elutionsmuster variierte daher auch beträchtlich in Abhängigkeit von der Dauer der Sonication: Je kürzer die Be-

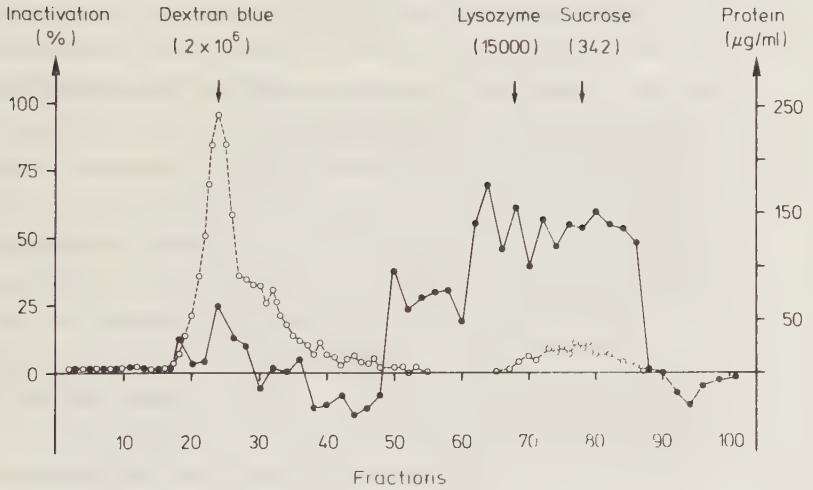


Abb. 23 :

Gelfiltration von Granulamaterie neutrophiler Granulozyten (Zellfraktionen 2 und 3 der Differentialzentrifugation), das durch Ultraschall homogenisiert worden war (Sommer). Dargestellt sind die Elutionsmuster des Proteins (o----o) und von Substanzen, die in der Lage sind, zugegebenen ECF bekannter Aktivität (1400 Eos/5 HPI) um den auf der Ordinate angegebenen Wert zu inaktivieren (●—●). Dextran blau, Lysozym und Saccharose dienten als Molekulargewichtsmarker.

schallung war, desto mehr verschob sich die Aktivität vom niedermolekularen Bereich zum Ausschlußvolumen hin.

Die Charakterisierung des Inaktivators nach Sonication der Granula ist unbefriedigend. Zur genaueren Analyse des Molekulargewichts und zur Klärung der Frage, ob es sich um eine einheitliche Substanz handelt, müssen daher Methoden gefunden werden, die das Material ohne größere Schäden spezifischer von der Granulamatrix loslösen. Zur Zeit kann man nur festhalten, daß die inaktivierende Substanz offenbar sehr fest an peroxidasepositive Granula gebunden vorliegt. Im Zusammenhang mit diesem Experiment muß noch erwähnt werden, daß in keiner Fraktion eosinophilotaktische Eigenaktivität zu finden war. Damit erscheint es unwahrscheinlich, daß in den Granula nur deshalb kein ECF zu finden ist, weil dieser durch den gleichzeitig vorhandenen Inaktivator maskiert wird; in diesem Fall wäre nach Auftrennung der Granulabestandteile nach dem Molekulargewicht zumindest geringe chemotaktische Aktivität zu erwarten.

2.4 Versuche zur Freisetzung von ECF und Inaktivator aus Zellfraktionen neutrophiler Granulozyten

Die subzelluläre Fraktionierung der Granulozyten ergab, daß sich inaktivierendes Material in den Granula-Fraktionen (2 und 3) und ECF-Aktivität in den Fraktionen mit ganzen Zellen und Kernen (1), der Mikrosomenfraktion (4) und dem Überstand (5) nachweisen lassen. Die eosinophilotaktische Aktivität in den Fraktionen stimulierter, vor allem aber unstimulierter Leukozyten war allerdings wesentlich niedriger als die Aktivität, die durch Stimulation der intakten Zellen zu gewinnen war. Es drängten sich daher folgende Fragen auf: Wie kommt es zur Freisetzung so großer Mengen an ECF, wenn in den isolierten Zellfraktionen nur so wenig nachweisbar ist?

Ist es möglich, den vielleicht durch Bindung an ein Träger- oder Vorläufermolekül inaktiven ECF irgendwie zu aktivieren oder aber eine de novo - Synthese anzustoßen?

Zur Klärung dieser Fragen wurden folgende Versuche unternommen:

Änderung der Stimulationsbedingungen

Bei Aktivierung der Granulozyten mit Ionophore A 23187 war aufgefallen, daß nach Stimulation bei 0°C anstatt bei 37°C kein ECF im Überstand, wohl aber in den sonicierten Zellen nachweisbar war. Man könnte daher annehmen, daß ECF in der Kälte zwar intrazellulär gebildet, aber erst in einem temperaturabhängigen Schritt freigesetzt wird. Die Leukozyten wurden daher bei 0°C mit Ionophore stimuliert und dann sofort homogenisiert, in der Hoffnung, in einer subzellulären Fraktion frische "ECF-Depots" zu finden. Unterschiede gegenüber Zellen, die bei 37°C stimuliert worden waren, konnten jedoch nicht gezeigt werden. Als Erklärung bietet sich an, daß sich das Signal bei 0°C zwar "in der Zelle festsetzt", daß aber die ECF-Generierung erst bei Wärmezufuhr (Homogenisierung!) abläuft.

Mit der gleichen Vorstellung, also eine ECF-Generierung zuzulassen, die Freisetzung aber zu verhindern, versuchten wir, die Ausschleusung des chemotaktischen Faktors in den Extrazellularraum durch Entzug von Calcium- und Magnesiumionen zu unterbrechen. Die übliche Aktivierung der Granulozyten mit Ionophore wurde also nach unterschiedlichen Zeitspannen durch die Zugabe von EDTA bzw. EGTA gestoppt und die Zellen dann in Gegenwart dieser Chelatoren homogenisiert und fraktioniert. EDTA und EGTA führten in Konzentrationen von 0,005 bis 0,01 M zwar zu einer wirksamen Unterdrückung der ECF-Freisetzung. Wegen der hemmenden Wirkung dieser Chemikalien in der Boyden-Kammer (siehe Material und Methoden) und der geänderten Fraktionierung (kleine Membran-

*

vesikel) konnten jedoch die chemotaktischen Aktivitäten nur mit Vorsicht beurteilt werden. Das einzig sichere Ergebnis dieser Versuche bestand darin, daß im Vergleich zu den übrigen Zellfraktionen weniger ECF in der Fraktion 5 (200 000 g-Überstand) zu finden war. Das bedeutet, daß zumindest ein Teil des in dieser Fraktion nachweisbaren ECF aus der während der Fraktionierung fortlaufenden Sekretion des Faktors stammt. ECF in Zellfraktion 5 ist also nicht notwendigerweise primär in dem dort gewonnenen Zytoplasma lokalisiert. Um diese, mit unseren Daten letztlich nicht auszuschließende Möglichkeit zu klären, müßte es möglich sein, zytoplasmatisches Material von Substanzen zu trennen, die vor oder während der Homogenisierung von anderen, partikulären Zellstrukturen losgelöst oder aktiv freigesetzt wurden.

Die geschilderten Experimente unterstreichen, daß es nicht oder nur schwer möglich ist, den Prozeß der ECF-Generierung und -Freisetzung mit den oben angegebenen Methoden auf irgendeiner Stufe "einzufrieren".

Versuche zur ECF-Gewinnung aus isolierten Zellfraktionen

Wir versuchten nun, ECF direkt aus den isolierten, frischen (d.h. nicht vorher eingefrorenen) Zellfraktionen zu gewinnen. Dazu wurden diese mit Ionophore - mit dem Zusatz verschiedener Konzentrationen an CaCl_2 und MgCl_2 - sowie unter stark hypotonen Bedingungen inkubiert; beides führt bekanntlich bei Verwendung intakter Zellen zu einer starken ECF-Produktion. Die Inkubation mit Ionophore und die hypotone Lyse der Zellstrukturen führte jedoch nur in Fraktion 1 zu einer merklichen ECF-Freisetzung. Dies aber läßt sich zwanglos auf die Anwesenheit von intakten Zellen (5 - 20 %!) in dieser Fraktion zurückführen. Auch die anfänglich erfolgversprechende Wirkung von Calcium- und Magnesiumionen (in einer Konzentration

von je 2 - 3 mM) ließ sich in Kontrollversuchen im wesentlichen durch eine Optimierung des TACM-Puffers beim Einsatz in der Boyden-Kammer erklären: Die Eosinophilen wanderten unter annähernd physiologischen Bedingungen (Serumkonzentrationen: Ca^{++} : 2,25-2,5 mM, Mg^{++} : 0,6-1,0 mM) einfach schneller, ohne daß sich die ECF-Konzentration der Zellfraktionen geändert hatte.

Da also die direkte Stimulation der isolierten Zellstrukturen erfolglos war, wurde versucht, eine ECF-Freisetzung durch Rekombination von Zellfraktionen unstimulierter und stimulierter Granulozyten in Gang zu setzen. Diesem Versuchsansatz lag die Hypothese zugrunde, daß möglicherweise durch die Stimulation in den Zellen eine Substanz gebildet wird, die in bestimmten Zellkompartimenten die ECF-Produktion einleitet. Von den getesteten Möglichkeiten ließ sich nur in den Fällen vermehrte chemotaktische Aktivität nachweisen, in denen Fraktion 1 bzw. intakte Leukozyten mit den Fraktionen 4 und 5 kombiniert wurden; eine Wirkung von Ionophore konnte dabei ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse variierten jedoch sehr stark von Präparation zu Präparation (unveränderte bis über 10-fach gesteigerte Aktivität!), ohne daß sichere Gesetzmäßigkeiten zu erkennen gewesen wären.

Die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist wohl auf die schwierige Standardisierung der Zellfraktionierung, vor allem aber auf die Labilität und komplexen Interaktionen der Substanzen in dem Gemisch an biologisch aktivem Material zurückzuführen. So zeigte sich z.B. bei einfacher Inkubation eines postgranulären Überstandes ionophorestimulierter Zellen eine deutliche Fluktuation der chemotaktischen Aktivität mit einem Maximum nach 20 - 30 Minuten bei 37°C bzw. 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur (Abb. 24). Parallel dazu inkubierter ECF aus dem zellfreien Überstand aktivierter Zellen (ECF-I) zeigte keine signifikanten Veränderungen.

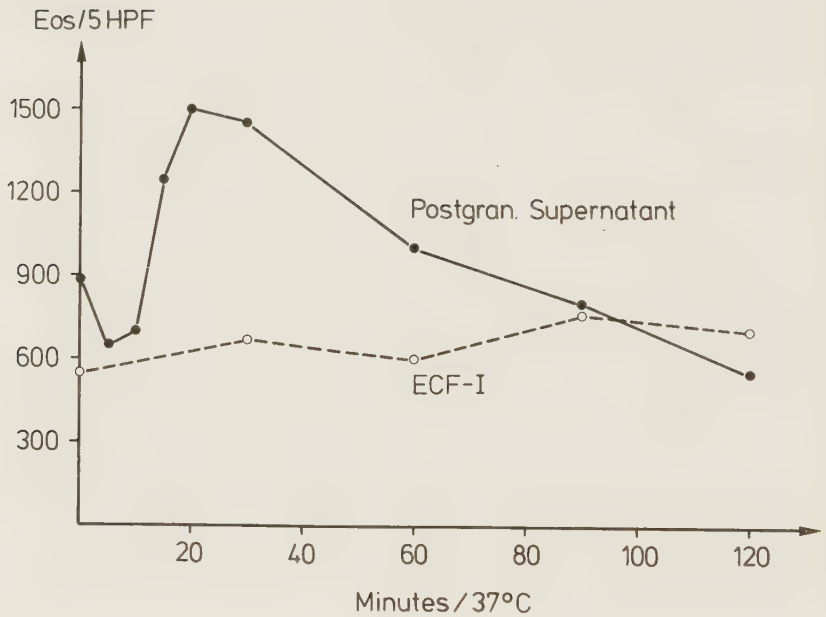


Abb. 24 :

Inkubation eines postgranulären Überstandes homogenisierter Granulozyten über 2 Stunden bei 37°C (Postgran. Supernatant: ●—●); ECF aus dem Überstand intakter Zellen (ECF-I: o---o) wurden zur Kontrolle unter den gleichen Bedingungen inkubiert. In beiden Fällen wurden die Leukozyten vorher mit Ionophore A 23187 stimuliert (siehe Material und Methoden).

Zusammenfassend kann man also sagen, daß ECF sich mit den hier angewandten Methoden nur aus intakten Zellen, nicht jedoch aus isolierten Zellfraktionen freisetzen läßt. Wie schon im Zusammenhang mit den in Abschnitt 1.2 beschriebenen Experimenten (hypotone Lyse) angedeutet, scheinen aber in den Granulozyten Faktoren zu existieren, die auch ohne bzw. noch nach Anstoß von außen (Ionophore, Phagozytose, hypotone Lyse) in der Lage sind, die ECF-Produktion einzuleiten oder zu modifizieren.

Extraktionsversuche

Eine Reihe weiterer Experimente wurden unternommen, um evtl. durch eine physikochemische Behandlung der einzelnen Zellfraktionen eine Aktivierung von ECF oder Inaktivator zu erreichen. Die Fraktionen wurden wie folgt behandelt:

- KCl (1,0 M) bei 4°C über Nacht;
- Triton X-100, Nonidet P 40, Deoxycholat (je 0,01 und 0,5 %) bei 4°C, 3 Stunden;
- Glycin-HCl-Puffer, pH 3,0 / Bicarbonat-Puffer, pH 10,5 bei 4°C, 3 Stunden;
- Kochen in TCM-Puffer, pH 7,4, 15 Minuten;
- Extraktion mit Chloroform/Methanol (3:2).

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Fraktionen abzentrifugiert und Überstand und Sediment vor und nach Dialyse auf ECF und Inaktivator hin ausgetestet. Wegen der Interferenz vieler Substanzen in der Boyden-Kammer (siehe Material und Methoden) waren die Ergebnisse nicht immer eindeutig zu beurteilen. In keinem Fall jedoch konnte ein signifikanter Anstieg von ECF- oder Inaktivator-Aktivität nachgewiesen werden.

Die Versuche zur Freisetzung von ECF und Inaktivator aus Zellfraktionen neutrophiler Granulozyten lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß es in keinem Fall eindeutig gelang, ECF aus Zellfraktionen in Konzentrationen freizusetzen, die mit der ECF-Produktion intakter Granulozyten vergleichbar gewesen wäre. Damit ergeben sich folgende Schlußfolgerungen:

1. ECF ist nicht (biologisch aktiv) präformiert und kann mit den hier angegebenen Methoden auch nicht freigesetzt werden. Dies spricht für eine Aktivierung des Faktors erst auf den Stimulationsreiz hin.
2. Nur vitale Zellen, nicht jedoch Zellfraktionen setzen ECF nach Stimulierung mit Ionophore und während der Phagozytose frei. Die Fraktionen zeigen allerdings ein gewisses "Eigenleben" (Abb. 24). Es müssen daher unterschiedliche Aktivierungsstufen mit unterschiedlichen strukturellen und biochemischen Voraussetzungen postuliert werden (Signalerkennung $\longrightarrow$ "second messenger" $\longrightarrow$ Aktivierung von ECF aus Vorstufen oder de novo-Synthese $\longrightarrow$ Freisetzung).
3. Nach der Zellaktivierung erfolgt keine wesentliche intrazelluläre Speicherung, sondern der einmal gebildete Faktor wird wahrscheinlich sofort in den Extrazellularraum freigesetzt.

V. DISKUSSION

1. Subzelluläre Lokalisation von ECF und Inaktivator

1.1 Funktionelle Beziehung zu anderen Neutrophilenbestandteilen und Vergleich mit ECF-A

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der Zellorganellen von neutrophilen Granulozyten, die in der Lage sind, ECF zu produzieren. Ferner sollten andere Strukturen in den gleichen Zellen analysiert werden, die Material enthalten, das diesen chemotaktischen Faktor inaktivieren kann ("Inaktivator"). Wesentliche Voraussetzung dazu war, daß die Neutrophilen im Vergleich zu den in der Einleitung beschriebenen Eosinophilen bereits sehr viel gründlicher untersucht worden sind (61, 65, 87).

Morphologisch ähneln die Neutrophilen weitgehend den übrigen Granulozyten. Auffällige Unterschiede sind der stärker segmentierte Kern und die sehr feinen, braun-violett gefärbten Granula (Pappenheim-Färbung). Während der Entwicklung im Knochenmark (6-12 Tage) werden die bei allen Granulozyten anzutreffenden Teilungs- und Reifungsstadien durchlaufen (6): Im Stadium des großen Promyelozyten erscheinen die ersten, peroxidasepositiven Granula ("primary granules"), die aufgrund ihres Färbeverhaltens auch "azurophile Granula" genannt werden. Ihre Produktion im Golgi-Apparat der Zelle sistiert beim Übergang zum Myelozyten. Auf dieser Stufe beginnt die Synthese der peroxidasenegativen Granula, die die lichtmikroskopische Differenzierung in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten ermöglichen und daher auch "spezifische" oder auch "secondary granules" genannt werden. Im reifen Neutrophilen finden sich etwa doppelt so viele spezifische wie azurophile Granula. Im Lichtmikroskop dominieren jedoch die größeren Azurophilen, während

die lichtmikroskopisch kaum erkennbaren spezifischen Granula den rosa Hintergrund bilden.

In der reifen Zelle wurden mit biochemischen und zytochemischen Methoden eine Vielzahl von biologisch aktiven Substanzen nachgewiesen, von denen ein großer Teil in den Zellgranula gespeichert wird (Referenzen siehe 49): Die großen azurophilen Granula enthalten mikrobizide Substanzen (Peroxidase, Lysozym, kationische Proteine) sowie eine große Zahl von sauren Hydrolasen. Neben diesen für Lysosomen charakteristischen Enzyme mit pH-Optimum im sauren Bereich, deren Hauptfunktion wohl in der Verdauung exogenen und endogenen Materials besteht, wurden jedoch auch Proteasen gefunden, die bei physiologischem pH wirksam sind ("neutrale Proteasen": Elastase, Kathepsin C und eine 3. Protease; die Lokalisation der Kollagenase ist noch umstritten). Diese Enzyme werden heute im wesentlichen für die Schäden bei Immunkomplexkrankheiten wie Rheumatoide Arthritis, Glomerulonephritis und Serumkrankheit verantwortlich gemacht. Sie greifen direkt die Grundsubstanzen des Bindegewebes (Kollagen, Elastin und Proteoglykane) an und sind auch indirekt an der Auslösung von Entzündungsprozessen beteiligt: Sie aktivieren Komponenten des Komplement- und Kininsystems, führen zu einer plasminunabhängigen Fibrinolyse, bauen Gerinnungsfaktoren ab und beeinflussen die Funktion von Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten.

Die kleineren spezifischen Granula enthalten dagegen kaum saure Hydrolasen, jedoch ebenfalls mikrobizide Faktoren (Lysozym, Laktoterrin) sowie Vitamin B₁₂- und eisenbindende Proteine.

Andere biologisch aktive Bestandteile neutrophiler Leukozyten konnten bisher noch nicht eindeutig intrazellulär lokalisiert werden: Hierzu gehören weitere Faktoren mit Wirkung auf das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System, Material, das der "slow reacting substance of anaphylaxis" aus Mastzellen (SRS-A) ähnelt, Modulatoren der

Histaminfreisetzung, Thromboxane, Prostaglandine sowie möglicherweise ein drittes Interferon.

Ebenfalls unklar ist noch die Lokalisation der meisten Faktoren, die die chemotaktische Wanderung anderer Zellen auslösen oder hemmen. Chemotaktische Faktoren aus neutrophilen Granulozyten kann man in Substanzen einteilen, die entweder direkt oder indirekt über die Aktivierung anderer Systeme ihre Wirkung entfalten. Direkt wirksame Faktoren lassen sich entweder extrahieren (14, 135) oder werden bei der Phagozytose freigesetzt (124, 153) und wirken vor allem auf andere Neutrophile und Makrophagen. Indirekt wirken Neutrophilen-Enzyme, die chemotaktisch aktive Komplement- (138, 150), Fibrin- (126) oder Kollagen-Spaltprodukte (69) freisetzen. Den Faktoren, die die Leukozytenwanderung stimulieren, kann man hemmende Faktoren gegenüberstellen: Dazu gehören der von segmentkernigen (und mononukleären) Leukozyten sezernierte "Neutrophil-Immobilizing-Faktor" (NIF) (53) und komplementabbauende Enzyme (150).

Der in dieser Arbeit untersuchte ECF (35, 37, 92, 93) gehört in die Gruppe der direkt, d.h. insbesondere komplementunabhängigen Faktoren. Er unterscheidet sich von den oben erwähnten Substanzen durch die Art der Freisetzung (Ionophore, hypotone Lyse, Phagozytose), seine hohe Spezifität für Eosinophile und das niedrige Molekulargewicht (<1000). Da ein großer Teil der beschriebenen biologisch aktiven Substanzen in den Zellgranula gespeichert ist, wurde auch zunächst an eine granuläre Lokalisation des ECF gedacht.

Diese Hypothese fußte auf Untersuchungen von Austen u.a. (139), die einen von Molekulargewicht und Spezifität her ähnlichen Faktor (ECF-A) in den Granula von Ratten-Mastzellen nachweisen konnten (siehe Einleitung). Ein auffälliger Unterschied zwischen beiden Faktoren liegt jedoch darin, daß ECF-A sich vollständig aus der unstimulierten Mastzelle extrahieren läßt, während in unstimulierten Neutrophilen kaum ECF nachzuweisen ist. Dies spricht nicht unbedingt gegen einen präformierten Neutrophilen-ECF, da die biologische Aktivität des prä-

formierten Faktors auch durch gleichzeitig vorhandene Inaktivatoren maskiert werden könnte. Eine zumindest ebenso plausible Erklärung wäre jedoch eine Neusynthese des ECF (de novo oder "aus Fertigteilen") erst im Augenblick der Zellstimulierung. Die Analyse der Neutrophilenstimulierung jedenfalls spricht gegen eine intragranuläre Lokalisation und liefert eher Argumente für eine Neusynthese des ECF als Folge der Zellaktivierung (Abb. 10 und 12):

Sowohl bei der bereits genauer untersuchten Stimulierung der Granulozyten durch Ionophore A 23187 und opsonisierte Zymosanpartikel (35, 92) als auch bei der in dieser Arbeit erstmals angewandten hypotonen Lyse der Zellen unterscheidet sich das Freisetzungsmuster des chemotaktischen Faktors erheblich von dem der granulären Enzyme. Ebenso besteht keine positive Korrelation zwischen der Stärke der ECF- und Granulaenzym-Sekretion: Während Ionophore zu einer starken ECF- und nur mäßigen Enzymfreisetzung führt, ist die Phagozytose offensichtlich der schwächere Reiz zur ECF-, jedoch stärkere Stimulus zur Enzymsekretion. Zeitlich liegt der ECF-Gipfel in diesen beiden Fällen deutlich vor der erst allmählich einsetzenden Enzymsekretion (Abb. 10), während im Fall der hypotonen Lyse (Abb. 12) die Enzyme sofort, ECF jedoch erst nach einer gewissen Latenzzeit im Zellüberstand erscheint.

Die hier beschriebene ECF-Freisetzung durch osmotische Lyse der Granulozyten hat wohl keine biologische Bedeutung, da derart hypotone Zustände ($< 20 \text{ mOsmol/l}$) im Organismus kaum vorkommen dürften (physiologische Osmolarität: $290 - 305 \text{ mOsmol/l}$). Der Versuchsansatz liefert aber möglicherweise gute Einblicke in die ECF-Generierung, da keine Fremdsubstanzen (Ionophore, Zymosan) in das System eingebracht werden, der Leukozyt sozusagen ganz auf sich gestellt ECF produziert. Interessant ist vor allem, daß eine Zerstörung der Zellen durch Ultraschall (Sonication) diesen Effekt nicht ergibt. Osmotische Lyse muß also im Gegensatz zur wahllosen

Zerstörung der Leukozyten durch Ultraschall über ganz bestimmte, bisher noch unbekannte, physikochemische Zustandsänderungen der Zelle (Eröffnung osmotisch labiler Strukturen, Zustandsänderung der Zellmembranen, Elektrolytverschiebungen o.ä.) zur Aktivierung von Synthese- oder Hemmung von Inaktivierungsmechanismen führen, die dann die ECF-Freisetzung in Gang setzen.

Dies ist vermutlich eher eine Synthese als eine Freisetzung von präformiertem Material. Dafür spricht, daß der Vorgang eine gewisse Anlaufzeit, Wärmeenergie und divalente Kationen benötigt. Völlig ungeklärt ist zur Zeit auch das in Abb. 15 besonders deutliche Zickzack-Muster der Freisetzung mit extremen Maxima und Minima innerhalb weniger Minuten und die Tatsache, daß nur intakte, ganze Zellen, nicht aber Homogenate und isolierte Zellfraktionen ECF unter hypotonen Bedingungen produzieren. Da die osmotische Lyse von Zellen bisher nur wenig bei kernhaltigen Zellen, sondern vor allem bei Erythrozyten untersucht wurde (120), sind die Kenntnisse auf diesem Gebiet noch lückenhaft, und die Interpretation der Befunde kann zur Zeit über das oben gesagte noch nicht hinausgehen.

Zusammenfassend zeigen diese Versuche: Der aus neutrophilen Granulozyten stammende eosinophil chemotaktische Faktor (ECF) ist wahrscheinlich nicht präformiert und liegt nicht biologisch aktiv gespeichert in den Zellgranula vor. In dieser Hinsicht bestehen also deutliche Unterschiede zu dem ansonsten ähnlichen ECF-A aus Mastzellen.

1.2 Lokalisation durch Zellfraktionierung

Die oben beschriebene Messung bestimmter Enzyme als Indikator der Degranulation von Leukozyten beruht auf dem Konzept der "Leitenzyme", das im wesentlichen von de Duve und Mitarbeitern

entwickelt wurde. Sie konnten am Beispiel der Leber zeigen, daß manche Enzyme nur in ganz bestimmten Zellorganellen lokalisiert sind (z.B. NAD-Pyrophosphorylase im Zellkern, Cytochromoxidase in Mitochondrien, saure Phosphatase in Lysosomen oder Glukose-6-Phosphatase im Endoplasmatischen Retikulum). Somit ist es möglich, die einzelnen subzellulären Strukturen anhand ihrer spezifischen Enzymausstattung zu identifizieren. De Duve's Arbeitsgruppe war es auch, die an der Leber die Grundlagen der Gewebefraktionierung durch Zentrifugation erarbeitete (39). Nachdem die hier geschilderten Versuche ergeben hatten, daß ECF wahrscheinlich nicht in den neutrophilen Granula gespeichert ist, versuchten wir, mit dieser Technik die intrazelluläre Lokalisation des chemotaktischen Faktors und seines Inaktivators zu bestimmen.

Granulozyten sind vom Zelltyp her sehr gut zur subzellulären Fraktionierung geeignet, da sie relativ hoch angereinigt werden können (93-98%), und kein Bindegewebe die Zellgewinnung erschwert. Die Homogenisierung menschlicher Granulozyten bereitet jedoch im Vergleich z.B. zu Kaninchenzellen (3) erhebliche Schwierigkeiten. Von vielen Experimentatoren wurde die hohe Widerstandsfähigkeit der Leukozyten bei Verwendung von isotoner, 0,34 M Saccharoselösung (66,109) durch Einsatz von Heparin (1,27,66,147), hypotoner Saccharose (20) oder einer Kombination von beiden (121) umgangen. Obwohl manche unerwünschten Effekte von Heparin durch Protaminsulfat o.ä. aufzuheben sind (86) wurde in dieser Arbeit eine Methode ohne Heparinzusatz entwickelt (siehe Ergebnisse, 2.1).

Um eine erste grobe Orientierung zu erhalten, wurde das Zellhomogenat durch Differentialzentrifugation aufgetrennt, und im Anschluß daran erfolgte die weitere Analyse des so vorgereinigten Materials durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten. Bei allen Schritten versuchten wir, uns möglichst eng an die von de Duve u.a. erarbeiteten Kriterien für diese Techniken zu halten (10,39,40,97).

Die isolierten Zellfraktionen wurden durch Bestimmung bekannter Leitenzyme charakterisiert. Dabei bewährten sich die bereits von anderen Autoren in Neutrophilen gefundene Enzyme, während zusätzlich ausgetestete Leitenzyme der Leber unbefriedigende Resultate erbrachten: Succinatdehydrogenase war mit der angegebenen Methode nicht nachweisbar (Neutrophile besitzen kaum Mitochondrien!) und die Aktivität der Mikrosomenmarker Glukose-6-Phosphatase, 5'-Nukleotidase und alkalische Phosphodiesterase I war so niedrig, daß man zumindest bei den beiden ersten Enzymen eine unspezifische Hydrolyse durch andere Zellphosphatasen annehmen muß.

Die Differentialzentrifugation erbrachte eine erste grobe Einteilung (Abb. 17 und 18): Zellfraktionen mit chemotaktischer Aktivität enthielten entweder ganze und unvollständig homogenisierte Zellen (Fraktion 1), leichte Membranen (Fraktion 4) oder primär lösliches (Zytoplasma) bzw. durch Homogenisierung gelöstes Material (Fraktion 5). Die Granulafraktionen 2 und 3 hingegen waren in der Lage, zugegebenen Standard-ECF zu inaktivieren.

Die Ergebnisse wurden bestätigt und erweitert durch die Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 19, 20, 21): Die ECF-haltigen Strukturen konnten sowohl enzymatisch wie auch nach Oberflächenmarkierung mit ^{125}Jod als Zellmembranen identifiziert werden (Abb. 19, 20). Bei genauerer Analyse zeigten sich zwei Maxima im Bereich von $1,13 - 1,17 \text{ g/cm}^3$. Dies entspricht einem Bereich, in dem auch bei anderen Geweben Strukturen des endoplasmatischen Retikulums und der Plasmamembran sedimentieren (10, 42). Unklar ist zur Zeit noch, ob der Doppelgipfel nur dadurch bedingt ist, daß die Zellmembranen durch die Homogenisierung zu unterschiedlich großen Bruchstücken auseinander gerissen werden (48), oder ob es sich hierbei um völlig unterschiedliche Membranbezirke der Zelle handelt. Im Dichtebereich um $1,14 \text{ g/cm}^3$ äquilibrieren außerdem auch die wenigen Mitochondrien der Neutrophilen (115). Der hohe Gehalt der Struk-

turen an plasmamembranspezifischer Mg-ATPase (63) läßt jedoch vermuten, daß zumindest ein Teil als äußere Membran der Zellen anzusprechen ist.

Die Versuche zeigen in Übereinstimmung mit anderen Autoren (20, 121, 147), daß im Gegensatz zu Kaninchengranulozyten (3) und zytochemischen Befunden (5, 6) die alkalische Phosphatase in Menschenzellen ebenfalls in Mikrosomen zu lokalisieren ist. Die saure p-NP-Phosphatase wird abhängig von den Versuchsbedingungen zum Teil strukturgebunden gefunden (20); der größte Teil scheint jedoch entweder primär im Zytoplasma lokalisiert zu sein oder wird sehr leicht von Membranstrukturen abgelöst. Die Bedeutung der alkalischen Phosphodiesterase I ist noch nicht geklärt. Da das intrazelluläre Verteilungsmuster von dem der anderen Enzyme deutlich abweicht, muß man annehmen, daß es sich um ein separates Enzym handelt. Die niedrige Aktivität läßt aber daran denken, daß möglicherweise das Substrat unspezifisch umgesetzt wird, daß es sich also nicht unbedingt um "die Phosphodiesterase I" handelt.

Wie schon bei der Differentialzentrifugation findet sich das ECF-inaktivierende Material auch bei der Dichtegradientenzentrifugation in den Granula der Zellen (Abb. 19, 21). Im Gegensatz zu elektronenmikroskopischen Untersuchungen (6) und einigen biochemischen Studien (1, 20, 66, 109, 121) unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch Veröffentlichungen anderer Autoren (125, 147, 148), nach denen es mindestens 3 Untergruppen der Granula gibt: 2 peroxidasenegative Populationen (A: $1,23 \text{ g/cm}^3$, C: $1,19 \text{ g/cm}^3$) mit je etwa 50% Lysozym und eine Gruppe peroxidasepositiver Granula in einem mittleren Dichtebereich (B: $1,21 \text{ g/cm}^3$). Diese letzte Gruppe ließ sich in dieser Arbeit auf einem flachen Gradienten hoher Dichte in 2 weitere Untergruppen auftrennen (Abb. 21: B_1 - $1,21 \text{ g/cm}^3$ und B_2 - $1,22 \text{ g/cm}^3$). Inaktivierendes Material ist in diesen peroxidasepositiven Granula und vermutlich in der hier B_1 genannten, leichteren Untergruppe gespeichert. (Andere

Autoren ordnen diese Untergruppe den peroxidasepositiven Granula der Gruppe A zu.) β -Glycero-Phosphatase ist ähnlich verteilt wie Lysozym und β -Glucuronidase wie Peroxidase (mit geringer Aktivität allerdings auch im mikrosomalen Bereich).

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Problematik der Begriffe "azurophile" und "spezifische" Granula im Zusammenhang mit menschlichen Neutrophilen. Sie wurden durch mikroskopische Untersuchungen geprägt und unterscheiden die Granula aufgrund ihrer Synthese in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Zelle. Schon morphologisch war v. a. bei den spezifischen Granula eine beträchtliche Heterogenität aufgefallen (6, 19), die durch Trennung dieser Organellen nach physikalischen Kriterien z. B. in der Dichtegradientenzentrifugation bestätigt wird. Vermutlich können durch noch höher auflösende Gradienten weitere Untergruppen gefunden werden. Es ist jedoch fraglich, ob diese auch mit unterschiedlichen Funktionen korrelieren, da kinetische Untersuchungen der letzten Jahre die einfache, mikroskopische Zweiteilung unterstützen:

Sowohl bei unspezifischer Adhärenz an Oberflächen (149) und bei der Phagozytose von Bakterien, Immunkomplexen oder Latexpartikeln (96, 150, 151) als auch bei Stimulation mit Ionophore A 23187, Phorbol-Myristat-Acetat, Concanavalin A und Leukozyten-Pyrogen (67, 88, 144, 148) degranulieren bevorzugt die Vesikel, die morphologisch als spezifische Granula identifiziert werden konnten (4). Ebenso sind besonders bei suboptimaler Stimulierung im Zellüberstand mehr Lysozym und Lactoferin als Peroxidase und saure Hydrolasen nachzuweisen. Wright u. a. konnten sogar direkt zeigen, daß nach Stimulation der Granulozyten mit Ionophore auf dem Dichtegradienten nur die auch in dieser Arbeit mit "C" bezeichnete Granulabande verschwindet (148). Unter funktionellen Gesichtspunkten kann man daher diese weniger dichten, peroxidasenegativen spezifischen Granula mit Sekretgranula endokriner Drüsen vergleichen (ohne dabei aber ihre Funktion auch im Phagosom zu vergessen) und sie den Peroxidase-

positiven azurophilen Granula gegenüberstellen, die nach enzymatischen Kriterien als echte Lysosomen anzusehen sind; Lysosomen aber sind für den intrazellulären Stoffwechsel zuständig. Unter besonderen Umständen wie z.B. bei "vergeblicher Phagozytose" "nicht-phagozytierbarer Oberflächen" (64) gelangen jedoch auch die Azurophilenbestandteile in den Extrazellularraum ("regurgitation during feeding", "reverse endocytosis", 143). Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich im wesentlichen für die Gewebsschäden bei den schon oben erwähnten Immunkomplexkrankheiten verantwortlich (49).

Die Substanz, die ECF inaktivieren kann ("Inaktivator") ist eindeutig in den peroxidasepositiven Granula lokalisiert, und damit offenbar nicht primär "zum Export bestimmt". Über die Natur des Materials ist wenig bekannt. Nach ausgiebiger Sonication lag das Molekulargewicht über 80 000 und in einem breiten Bereich unter 50 000, der vermutlich auf starke Zerkleinerung der Strukturen durch Sonication zurückzuführen ist (Abb. 23).

Problematisch war bei den Zellfraktionierungen, daß wir zwar den Inaktivator sicher nachweisen konnten - weil er offenbar vollständig präformiert in den Zellen vorliegt - daß aber die chemotaktische Aktivität immer nur sehr niedrig lag. Erstaunlich ist allerdings, daß überhaupt ECF gefunden werden konnte, da, wie schon in der Einleitung erwähnt, in einem nicht aufgetrennten Homogenat so gut wie kein aktiver ECF vorhanden ist. Die Abtrennung inaktivierender Granulafraktionen demaskiert also die vorhandene, mikrosomale Aktivität. Diese ist jedoch, auch wenn man technische Schwierigkeiten (Hemmung durch Saccharose usw.) berücksichtigt, immer noch sehr gering im Vergleich zu dem, was durch Stimulation aus den Zellen herauszuholen ist. Es wurde daher versucht, durch Änderung der Stimulationsbedingungen, Stimulation und Extraktion der isolierten Zellfraktionen "latenten" ECF zu aktivieren oder eine Synthese anzustoßen. Dies gelang mit den angegebenen Methoden nicht. Dies schließt

nicht aus, daß andere Verfahren doch noch zum Erfolg führen könnten.

Festzuhalten ist also, daß zwar chemotaktisch aktive Strukturen identifiziert werden konnten, deren Aktivität wohl auf eine gewisse Spontanfreisetzung von ECF zurückzuführen ist. Das entscheidende Bindeglied zwischen Reiz und ECF-Freisetzung konnte jedoch bisher noch nicht identifiziert werden.

2. Modell der ECF-Freisetzung und -Inaktivierung

Faßt man die bis heute bekannten Daten zusammen, so läßt sich folgendes Modell aufstellen (Abb. 25):

Menschliche Granulozyten sind in der Lage, einen niedermolekularen, eosinophilotaktischen Faktor (ECF) zu bilden. Die Freisetzung dieses Faktors erfolgt während der Phagozytose (92), durch Stimulation der Zellen mit Ionophore A 23187 (35) und nach hypotoner Lyse der Granulozyten (Abb. 13, 15). Durch Zellfraktionierung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß ECF selbst oder eine Substanz, die ECF aktiviert, wahrscheinlich aus der Plasmamembran stammt (Abb. 19, 20). Ein Vergleich der ECF-Kinetik mit der Degranulation unterstützt diese These: Der chemotaktische Faktor erscheint so schnell im Zellüberstand (Abb. 10, 11), daß nur die äußere Zellmembran oder andere, schnell zugängliche Zellstrukturen - z.B. oberflächen-nahe Bezirke des endoplasmatischen Retikulums oder des Zytoplasmas - als Quelle der Aktivität in Frage kommen. Eine granuläre Lokalisation von ECF halten wir auch deshalb für unwahrscheinlich, weil weder in Bezug auf den zeitlichen Verlauf noch auf die Stärke der Freisetzung eine positive Korrelation zwischen ECF-Produktion und Degranulation gefunden werden konnte (Abb. 10, 11, 13, 14).

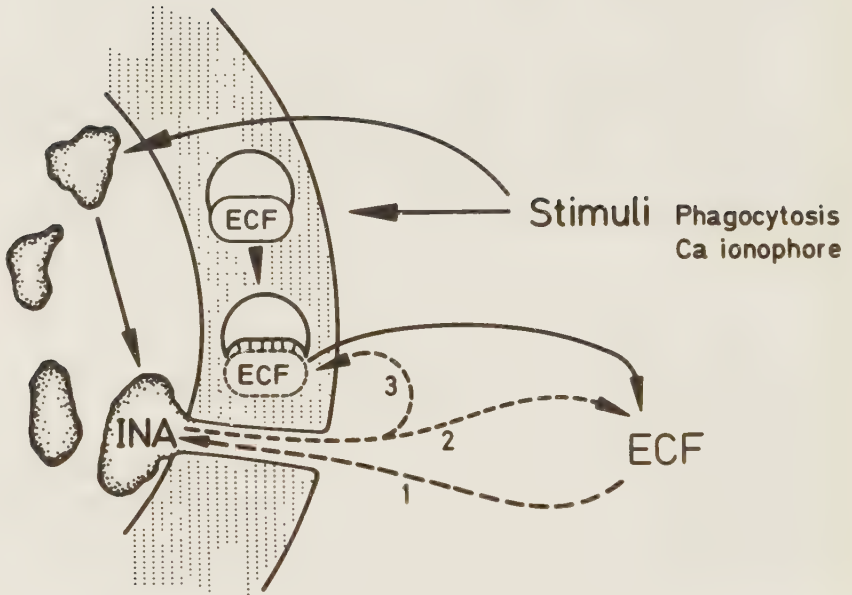


Abb. 25 :

Modell der ECF-Freisetzung und -Inaktivierung. Dargestellt ist ein Ausschnitt der Plasmamembran (schraffierter Bezirk), aus der durch verschiedene Stimuli ECF freigesetzt wird, sowie einige Granula, die durch die gleichen Stimuli zur Degranulation gebracht werden. Inaktivator (INA) bindet ECF entweder intrazellulär (1) oder nach Freisetzung in den Extrazellulärraum (2 und 3).

Warum aber nimmt nun in physiologischen Medien die chemotaktische Aktivität nach einem steilen Anstieg über 10 - 20 Minuten langsam wieder ab (Abb. 1)? Frühere Arbeiten hatten bereits gezeigt, daß dies nicht durch eine Instabilität von ECF, sondern nur durch seine Inaktivierung in den späteren Phasen der Zellaktivierung zu erklären ist. Inaktivatoren konnten dann auch sowohl in den Granulozyten selbst (37) als auch im Serum (91) nachgewiesen werden. Wenn man aber diese Aktivitätsabnahme auf die Wirkung eines ECF-Antagonisten aus Neutrophilen zurückführen will, so muß man gleichzeitig postulieren, daß das Material erst eine gewisse Zeit nach dem Beginn der ECF-Freisetzung mit dem chemotaktischen Faktor in Berührung kommt. Es ist nämlich bekannt, daß die Bindung von ECF innerhalb sehr kurzer Zeit erfolgt (37); eine gleichzeitige Aktivierung beider Substanzen würde daher die chemotaktische Aktivität sofort "im Keim ersticken".

Unsere Ergebnisse zeigen eine einfache Lösung dieses Problems: Da der Inaktivator in den Zellgranula lokalisiert ist, entfaltet er seine Wirkung erst bei Degranulation der Leukozyten, damit aber deutlich abgesetzt vom Beginn der ECF-Freisetzung (Abb. 10, 11). Die granuläre Lokalisation erklärt auch, warum der Aktivitätsabfall von ECF bei stärkerer Degranulation z.B. während der Phagozytose von Zymosanpartikeln deutlicher ausgeprägt ist als z.B. bei Stimulation der Zellen mit Ionophore. Ein und derselbe Reiz steuert also sowohl die Freisetzung als auch die Inaktivierung des chemotaktischen Faktors. Unklar ist allerdings noch, wo die Interaktion zwischen beiden Substanzen erfolgt. Die Lokalisation des Inaktivators in den mehr am intrazellulären Stoffwechsel beteiligten azurophilen Granula spricht eher dafür, daß ECF in die Zelle aufgenommen wird und dann mit dem inaktivierenden Granulainhalt in Berührung kommt (Nr. 1 in Abb. 25); eine solche Möglichkeit wird z.B. auch für die Kontrolle der Aktivität von SRS-A durch die eosino-

philen Granulozyten diskutiert (98). Möglicherweise wird der Inaktivator aber auch ähnlich wie Peroxidase und β -Glucuronidase "sezerniert", so daß er ECF extrazellulär inaktivieren (Nr. 2 in Abb. 25) oder sogar schon Einfluß auf die ECF-Freisetzung haben könnte (Nr. 3 in Abb. 25).

Der Mechanismus der Interaktion zwischen ECF und Inaktivator ist, wie bereits mehrfach erwähnt, noch weitgehend unbekannt. Die Ergebnisse früherer Arbeiten lassen eher an eine spezifische Bindung als an enzymatischen Abbau denken (37). Ebenso besteht noch Unklarheit über die molekulare Struktur von ECF und Inaktivator. In jüngster Zeit ließen sich Beziehungen zur Klasse der Arachidonsäurederivate herstellen (128). Dies würde mit der Theorie übereinstimmen, daß ECF nicht präformiert in der Zelle vorliegt, sondern erst im Augenblick der Zellstimulierung gebildet wird, und könnte zur weiteren Klärung der Frage beitragen, inwieweit Ähnlichkeiten oder Unterschiede zu ECF-A aus Mastzellen bestehen.

Zusammenfassend zeigt dieses Modell der ECF-Freisetzung und -Inaktivierung, daß eine geordnete Zellfunktion entscheidend von einer differenzierten Zellstruktur abhängt: Erst die Lokalisation der beiden gegensätzlichen Substanzen in Zellkompartimenten mit unterschiedlicher Kinetik ermöglicht ihre zeitlich abgestufte und dem jeweiligen Reiz angepaßte Aktivierung und damit eine effektive Kontrolle der Wirkung des eosinophil chemotaktischen Faktors.

3. Physiologische und klinische Bedeutung von ECF

Die Frage nach der Funktion des ECF im Organismus ist schwer zu beantworten, da hierzu in vivo - Studien durchgeführt werden müssen, die mit den eingangs erwähnten Schwierigkeiten verbunden

sind. Obwohl bisher absolute in vivo-Beweise ausstehen, nimmt man heute allgemein an, daß der Mechanismus der Chemotaxis einen ganz wesentlichen Faktor für die Verteilung von Zellen im Organismus darstellt (50,114). Leukozyten als Prototypen beweglicher Zellen spielen dabei eine besondere Rolle und sind daher auch am gründlichsten untersucht worden. Zur Funktion gerade der eosinophilen Granulozyten stehen allerdings noch viele Fragen offen. Die Entdeckung eosinophilotaktischer Faktoren wurde daher mit der Erwartung verbunden, die Physiologie dieser Zellen besser verstehen zu lernen.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die zur Zeit bekannten eosinophilotaktischen Faktoren. Es fällt auf, daß nur die direkt von Zellen produzierten Faktoren spezifisch auf Eosinophile wirken, während die "humoralen", d.h. in Vorstufen im Serum vorhandenen Faktoren, unspezifisch alle Leukozyten oder bevorzugt Neutrophile anziehen. Zur Erklärung der meist "trägen Reaktionen" der Eosinophilen auf der einen Seite (29) und der deutlichen systemischen und lokalen Eosinophilie bei ganz bestimmten Erkrankungen (siehe Einleitung, 1.3) kann man daher folgendes hypothetisches (!) Modell konstruieren:

Die ersten Zellen, die auf einen Entzündungsreiz reagieren, sind meist die neutrophilen Granulozyten. Sie werden angelockt durch direkt chemotaktisch wirkende Produkte von Bakterien und Viren, sowie von Kollagen- und Fibrinabbauprodukten, Serumenzymen und Komplementfaktoren (54,87,137). Während dieser akuten Phase kommt es fast immer zu einer vorübergehenden Eosinopenie im Blut, die wahrscheinlich sowohl auf eine verminderte Freisetzung von Eosinophilen aus dem Knochenmark als auch auf eine gesteigerte Auswanderung der Zellen in den Entzündungsherd zurückzuführen ist (7). Diese frühe Eosinophilenmigration wird möglicherweise durch die Serumfaktoren (v. a. C5a) ausgelöst.

Chemotaktische Faktoren	Chemie, Molekulargew.	Freisetzung	Spezifität	Bemerkungen
I. "Zellprodukte"				
1) <u>Mastzellen:</u> a) ECF-A b) Oligopeptide (Basophile) c) Niedermolek. C.F. d) Histamin e) NCF-A	Tetrapeptide, 360- 390 Oligopeptide, 1300-2500 ? 150- 200 Aminosäure, 111 Protein, >160000	Extraktion, IgE, 48/80 u.a. Extraktion Extraktion Extraktion, IgE, 48/80 u.a. Extraktion	E > N > M E > N > M E > N E > N N > E	{ nicht chemokinerisch - in vivo fraglich - nur chemokinerisch -
2) <u>Lymphozyten:</u> a) ESP b) ECF _p	Protein, 24000-56000 ? >10000 (?)	Ag-Stim. sensib. Lymphoz. Lymphoz.-Fkt. + AgAk	E > N E > N	
3) <u>PMN:</u> a) ECF	AA-Derivat (?), <1000	Ionophore, AA, Phagozytose, Hypotone Lyse	E > N	Fkt. nicht präformiert, Inaktivierung durch Serum- und Zell-INA
4) <u>Tumor:</u> a) ECF-SLC b) Oligopeptide (?) c) NCF	300-400 ? 1500-3000 >16000	Extraktion des Tumors u.a. Gewebe und Körperflüssigkeiten	E > N > M E > N N > E	{ ähnlich Mastzell- Faktoren
5) <u>Bakterien:</u> a) Pneumokokken-Fkt- b) Bkt.-Proteinasen → Komplement	Peptid (?), 3600 Komplementfaktoren	Kulturfiltrat enzymatisch	E = N	andere Bkt.-Fkt.: selektiv chemotakt. für Neutrophile
6) ? a) HETE, HHT b) Lipid CF	AA-Derivate AA-Derivate (?)	Gewebeenzym + AA sensibil. Gewebe + Ag	E > N > M N > E > M	{ nicht präformiert
II. "Humorale Faktoren"				
1) <u>Komplementfkt.:</u> a) C3-Fragn. b) C5-Fragn. c) C567	Protein, 9000 Protein, 12000 Protein, ?	Komplementaktivierung u. direkt durch Serum- u. Gewebe-Enzyme - Komplementaktiv. ("reactive lysis")	{ N = E = M N > M, E	Inaktivierung: Serum-CFI Gewebe-CFI Proteasen Anaphylat.-INA
2) <u>Serumenzyme:</u> a) Kallikrein b) Plasminogen-Aktiv. c) C3-Convertase	Enzym { ~100000 Enzym { Enzym, 24000	Hageman-Fkt.- Aktivierung u.a. Alternative Pathway	N > M, E	Inaktivierung durch - O ₂ -Macroglob., C1 INA - O ₂ -Macroglobulin

Tabelle 5: Übersicht über die zur Zeit bekannten eosinophilotaktischen Faktoren, die entweder direkt von Zellen (I) oder aber aus Vorstufen im Serum (II) freigesetzt werden.
(Ausführliche Beschreibung siehe Abschnitt I. 2. 2)

Ausgeprägte lokale Eosinophilie tritt jedoch erst auf, sobald durch ganz bestimmte Reize (z.B. parasitäre und allergische Erkrankungen) zelluläre Immunmechanismen aktiviert werden: Sowohl T-Lymphozyten ($\rightarrow$ ESP, ECF_p) als auch B-Lymphozyten ($\rightarrow$ IgE $\rightarrow$ Mastzelle $\rightarrow$ ECF-A und andere Faktoren) induzieren dann antigen-spezifisch eine für den Organismus offenbar nützliche Akkumulation von Eosinophilen. Diese spät einsetzenden Reaktionen dürften die quantitativ und qualitativ entscheidenden sein und auch im Zusammenhang mit der zu diesem Zeitpunkt erfolgenden Einwanderung von Makrophagen stehen (137). Für "Nachschub", d.h. erhöhte Eosinophilenproduktion im Knochenmark sorgt vielleicht ein erst kürzlich entdecktes "Eosinophilopoietin", das analog zu anderen Knochenmarkstimulatoren wirkt (103). Kontrolliert wird das System durch Inaktivatoren, die sich sowohl gegen chemotaktische Faktoren aller Spezifitäten als auch gegen die mobilen Zellen richten. Zusätzlich entscheiden aber auch die chemotaktischen Faktoren selbst durch Deaktivierungsvorgänge über die Ansprechbarkeit der Leukozyten (50, 52).

Aufgabe des von Neutrophilen produzierten ECF ist es wahrscheinlich, in diesem komplexen System zusammen mit den eher unspezifischen humoralen Faktoren den Zeitraum bis zum Einsetzen der spezifischen Immunmechanismen zu überbrücken, die dann zur endgültigen Heilung führen. Wichtig ist dabei, daß bereits in diesem Stadium eine gewisse Spezifität der Reaktion gewährleistet ist, da das Ausmaß der ECF-Freisetzung doch deutlich von der Art des phagozytierten Materials abhängt (34).

Wenn aber neutrophile Granulozyten in der Lage sein sollen, über ECF Eosinophile am Ort ihrer Tätigkeit zu akkumulieren, so erscheint es verwunderlich, daß gerade in Gewebeschnitten mit hohen Neutrophilenkonzentrationen (z.B. in Abszessen) kaum eosinophile Granulozyten zu finden sind. Denn gerade in diesen Fällen kommt es doch zu einer starken Aktivierung der Leukozyten (Phagozytose!),

so daß auch eine starke ECF-Freisetzung zu erwarten wäre. Dazu ist folgendes zu bedenken:

Ursache einer vermehrten Akkumulation von Neutrophilen ist meist eine bakterielle Infektion. Bakterien aber produzieren - direkt oder über das Komplementsystem - so große Mengen an neutrophil-chemotaktischen Faktoren (87, 137), daß die ECF-Aktivität wahrscheinlich einfach überspielt wird, solange noch Bakterien vorhanden sind. Dazu kommt noch, daß in der akuten Entzündungsphase am Entzündungsort Substanzen gebildet werden, die eine anfängliche Eosinopenie im Blut verursachen ("Eosinopenische Faktor", 7), während gleichzeitig die Zahl der Neutrophilen deutlich ansteigt; in das Gewebe können aber nur so viele Zellen auswandern, wie das Blut auch herantransportiert. Da der genaue Mechanismus, über den die Eosinopenie ausgelöst wird, noch nicht bekannt ist, ist diese Erklärung für das Fehlen der eosinophilen Granulozyten aber nur mit Vorbehalt zu akzeptieren: Sie ist nur dann gültig, wenn primär eine Blockade der Eosinophilenfreisetzung aus dem Knochenmark, nicht jedoch die Emigration der Leukozyten aus dem Gefäßsystem für die Eosinopenie verantwortlich gemacht werden kann.

Die aufgeführten Befunde erklären, warum das Fehlen der Eosinophilen in der akuten Entzündungsphase nicht notwendigerweise gegen eine Rolle des ECF bei der Eosinophilotaxis spricht. Ein weiteres Argument für die Bedeutung des ECF liefert möglicherweise die Beobachtung, daß Eosinophile zwar nicht im Zentrum der Schädigung, dafür aber fast immer in der Peripherie nachzuweisen sind. Man hat dabei den Eindruck, als seien sie "eher Zuschauer als Teilnehmer am Kampf der Neutrophilen" (127).

Bestechend wäre folgende Erklärung: Die neutrophilen Granulozyten setzen ECF frei, der in die Peripherie diffundiert und Eosinophile anlockt. Während sie aber in Erfüllung ihrer Funktion absterben, wird der zellständige ECF-Inaktivator frei; der aber bindet ECF,

so daß im Zentrum des Geschehens die ECF-Konzentration absinkt, womit der Stimulus zur weiteren Zellwanderung wegfällt: Die Eosinophilen verbleiben also am Ort der höheren ECF-Konzentration in der Peripherie. Diese Überlegungen sind jedoch noch reine Spekulation, würden aber sehr schön dieses bis heute noch nicht verstandene, besondere Verhalten der eosinophilen Granulozyten erklären.

Haben die beschriebenen Vorgänge aber klinische Bedeutung, mit anderen Worten: Spielt die Akkumulation von Eosinophilen überhaupt irgendeine für das Individuum wesentliche Rolle? Diese Frage drängt sich auch deshalb auf, weil im Gegensatz zu anderen Leukozyten bis jetzt noch kein Fall beschrieben wurde, bei dem das Fehlen von Eosinophilen irgendeinen Nachteil für das betreffende Individuum bedeutet hätte.

Man schreibt heute den Eosinophilen 2 Hauptfunktionen zu (90):

1. Schon lange wurde vermutet, daß sie für die Homöostase am Entzündungsort verantwortlich sind bzw. als "Reparaturzellen" den Status quo wieder herstellen (80). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, daß Eosinophile Mastzellgranula phagozytieren (105) und eine Reihe von Substanzen enthalten, die Entzündungsmediatoren inaktivieren können: Histaminase inaktiviert Histamin (152), Arylsulfatase B die "slow reacting substance of anaphylaxis" (140) und Phospholipase D den "platelet aggregating factor" (77). Außerdem wurde ein Lipid beschrieben, das die Histaminsekretion hemmt (71) und Faktoren, die die Wiederauffüllung von Mediatorendepots nach der Freisetzung hemmen (81). Diese Funktion dürfte aber höchstens bei chronischen Prozessen eine Rolle spielen, da Eosinophile in größerer Zahl erst erscheinen, wenn akute Reaktionen (Anaphylaxie o.ä.) bereits abgelaufen sind (79).
2. Klinisch wichtiger ist es wahrscheinlich, daß die Eosinophilen bei Wurmerkrankungen offenbar spezifische Killerzellfunktionen

übernehmen (70, 104). Dies ist insofern erstaunlich, als Phagozytoserate und Abtötung von Mikroorganismen nur sehr gering ausgeprägt sind (22). Gegen Würmer bzw. deren Vorstufen scheinen Eosinophile jedoch eine Hauptwaffe des Organismus zu sein: Stimuliert durch T-lymphozytenabhängige Mechanismen (113, 118) binden sie sich über ihre Fc-Rezeptoren an die durch Immunglobuline opsonisierte Parasitenoberfläche (24, 102). Daraufhin bilden sie durch intrazelluläre Granulafusion große Vakuolen und sezernieren dann diese "geballte Ladung" gegen den Parasiten, was zu dessen Schädigung führt (106).

Es bleibt abzuwarten, ob dies die einzigen Aufgaben der eosinophilen Granulozyten sind. Bis dahin ist festzuhalten, daß der in dieser Arbeit untersuchte ECF als ein Faktor unter mehreren anzusehen ist, die eine Eosinophilie hervorrufen können. Neutrophile stellen allerdings schon aufgrund ihrer großen Zahl und Mobilität ein bedeutendes Potential zur Freisetzung eosinophilotaktischen Materials dar. Was aber noch wichtiger ist: Sie besitzen offenbar effektive Regulationsmechanismen zur Kontrolle dieser Funktion, da die gleichen Zellen, die ECF produzieren, diesen Faktor auch inaktivieren können. Da sie außerdem als erste Front der Abwehr fast bei jeder Entzündung anzutreffen sind, bietet ECF nach weiterer Untersuchung der Bedingungen, die seine Freisetzung auslösen, vielleicht Erklärungsmöglichkeiten für Fälle, in denen die Standarddiagnosen "Wurm oder Allergie" unbefriedigend sind.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Leukozyten sind zusammen mit anderen Phagozyten verantwortlich für die unspezifischen, zellulären Abwehrleistungen des Organismus. Während viele Funktionen der mononukleären und neutrophilen Granulozyten schon bekannt sind, herrscht noch weitgehend Unklarheit über die Bedeutung der eosinophilen Granulozyten. Das Auftreten einer lokalen (und systemischen?) Eosinophilie läßt sich am besten durch den Mechanismus der Chemotaxis erklären.

Spezifisch auf Eosinophile wirkende chemotaktische Faktoren werden v.a. bei allergischen Reaktionen von Mastzellen (Typ I - Reaktion) und Lymphozyten (Typ IV - Reaktion) gebildet. Vor kurzem konnte jedoch nachgewiesen werden, daß auch neutrophile Granulozyten in der Lage sind, durch einen niedermolekularen chemotaktischen Faktor (ECF) gezielt Eosinophile anzulocken. Freigesetzt wird dieser Faktor bei Stimulation der Zellen mit Ionophore A 23187 und während der Phagozytose von Zymosanpartikeln. Neben ECF enthalten Neutrophile aber auch eine Substanz, die den chemotaktischen Faktor inaktiviert.

Aufgabe dieser Arbeit war es, die zellulären Strukturen zu identifizieren, die diese beiden Substanzen enthalten oder synthetisieren, um den Freisetzungs- und Inaktivierungsvorgang besser zu verstehen und damit einem Verständnis der Rolle neutrophiler Granulozyten bei der Akkumulation Eosinophiler näher zu kommen.

Die Ergebnisse kann man folgendermaßen zusammenfassen:

1. ECF wird im neutrophilen Granulozyten nicht biologisch aktiv gespeichert, sondern wahrscheinlich erst im Augenblick der Zellaktivierung in schnell mobilisierbaren Membranbezirken (Plasmamembran?) de novo oder aus Vorläufermolekülen gebildet und sofort freigesetzt.

Inaktivator dagegen ist präformiert in peroxidasepositiven (azurophilen) Granula der Zelle enthalten. Diese Befunde ergaben sich aus kinetischen Untersuchungen und Zellfraktionierungen. Letztere bestätigten Veröffentlichungen zur Neutrophilen-Fraktionierung und konnten erstmals eine Unterteilungsmöglichkeit der peroxidasepositiven Granula in zwei weitere Untergruppen nach physikalischen Kriterien zeigen. Die Bedeutung dieser Ergebnisse wird diskutiert.

2. Über die schon bekannte Möglichkeit der Zellstimulierung durch Ionophore und Phagozytose hinaus wurde eine weitere Möglichkeit der Zellaktivierung gefunden:
Einfache hypotone Lyse der Neutrophilen führt zu starker ECF-Produktion mit eigentümlicher Freisetzungsperiodik. Dies ist insofern von Bedeutung, als Zerstörung der Zellen mit anderen Methoden nicht diesen Effekt ergibt. Einige Charakteristika dieses Vorgangs und die mögliche Bedeutung werden diskutiert.
3. Die Befunde werden in einem Modell zusammengefaßt, das die durch unterschiedliche Lokalisation bedingte "sinnvolle", d.h. hintereinandergeschaltete Freisetzungsmöglichkeit von ECF und Inaktivator zeigt. Es wird weiterhin versucht, diesen von Neutrophilen produzierten ECF in den Rahmen der bereits bekannten Faktoren einzuordnen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Avila, J.L., Convit, J. :
Studies on human polymorphonuclear leukocyte enzymes. I/II.
Biochim. Biophys. Acta 293, 397 (1973)
2. Baehner, R.L., Johnston, R.B. jr. :
Metabolic and bactericidal activities of human eosinophils.
Brit. J. Haematol. 20, 277 (1971)
3. Baggiolini, M., Hirsch, J.G., de Duve, C. :
Further biochemical and morphological studies of granule
fractions from rabbit-heterophil leukocytes.
J. Cell. Biol. 45, 586 (1970)
4. Bainton, D.F. :
Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear
leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms.
J. Cell. Biol. 58, 249 (1973)
5. Bainton, D.F., Forquhar, M.G. :
Differences in enzyme content of azurophil and specific granules
of polymorphonuclear leukocytes. I/II
J. Cell. Biol. 39, 286 (1968)
6. Bainton, D.F., Ulliyot, J.L., Farquhar, M.G. :
The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes
in human bone marrow.
J. Exp. Med. 134, 907 (1971)
7. Bass, D.A. :
Reproduction of the eosinopenia of acute infection by passive
transfer of a material obtained from inflammatory exudate.
Infection and Immunity 15, 410 (1977)
8. Basten, A., Boyer, M.H., Beeson, P.B. :
Mechanism of eosinophilia: I. Factors affecting the eosinophil
response of rats to trichinella spiralis.
J. Exp. Med. 130, 1271 (1969)
9. Basten, A., Beeson, P.B. :
Mechanism of eosinophilia. II. Role of the lymphocyte.
J. Exp. Med. 131, 1288 (1970)
10. Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-
Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M., Berthet, J. :
Analytical study of microsomes and isolated subcellular
membranes from rat liver.
J. Cell. Biol. 61, 188 (1974)

11. Begemann, H., Horwerth, H.G. :
Praktische Hämatologie.
Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1977
12. Bergmeyer, H.U. :
Methoden der enzymatischen Analyse.
Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie, 1970
13. Boot, J.R., Dawson, W., Kitchen, E.A. :
The chemotactic activity of thromboxane B₂: A possible
role in inflammation.
J. Physiol. 257, 47 p (1976)
14. Borel, J.F., Keller, H.U., Sorkin, E. :
Studies on chemotaxis. XI. Effect on neutrophils of lysosomal
and other subcellular fractions from leukocytes.
Int. Arch. Allergy Appl. Immun. 35, 194 (1969)
15. Boswell, R.N., Austen, K.F., Goetzl, E.J. :
Intermediate molecular weight eosinophil chemotactic factors
in rat peritoneal mast cells: Immunologic release, granule
association and demonstration of structural heterogeneity.
J. Immunol. 120, 15 (1978)
16. Bowers, W.E., Finkenstaedt, J.T., de Duve, C. :
Lysosomes in lymphoid tissue. I. The measurement of hydrolytic
activities in homogenates.
J. Cell. Biol. 32, 325 (1967)
17. Boyden, S. :
The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on
polymorphonuclear leukocytes.
J. Exp. Med. 115, 453 (1962)
18. Böyum, A. :
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human
blood: Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and
of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation
at 1 g.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97), 77 (1968)
19. Breton Gorius, J., Coquin, Y., Guichard, J. :
Cytochemical distinction between azurophils and catalase -
containing granules in leukocytes.
Lab. Invest. 38, 21 (1978)

20. Bretz, U., Baggiolini, M. :
Biochemical and morphological characterization of azurophilic and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes.
J. Cell. Biol. 63, 251 (1974)
21. Bretz, U., Baggiolini, M., Hauser, R., Hodel, C. :
Populations of nerve endings from rat brain.
J. Cell. Biol. 61, 466 (1974)
22. Bujak, J.S., Root, R.K. :
The role of peroxidase in the bactericidal activity of human blood eosinophils.
Blood 43, 727 (1974)
23. Burton, K. :
A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA.
Biochem. 62, 315 (1956)
24. Butterworth, A.E., David, J.R., Franks, D., Mahmoud, A.A.F., David, P.H., Starrock, R.F., Houba, V. :
Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to 5⁴Cr-labeled schistosomula by *Schistosoma mansoni*. I. Damage by purified eosinophils.
J. Exp. Med. 145, 136 (1977)
25. Chavin, S.I., Johnson, S.M., Holliman, A. :
Plasma membrane-associated immunoglobulins and other polypeptides of pig mesenteric node lymphocytes.
Biochem. J. 148, 417 (1975)
26. Chen, P.S., Toribara, T.Y., Warner, H. :
Microdetermination of phosphorus.
Anal. Chem. 28, 1765 (1956)
27. Chodirker, W.B., Bock, G.N., Vaughan, J.H. :
Isolation of human PMN leukocytes and granules: Observation on early blood dilution and on heparin.
J. Lab. Clin. Med. 17, 9 (1968)
28. Clark, R.A.F., Gallin, J.I., Kaplan, A.P. :
The selective eosinophil chemotactic activity of histamine.
J. Exp. Med. 142, 1462 (1975)
29. Clark, R.A.F., Kaplan, A.P. :
Eosinophil leukocytes: Structure and function.
Clinics in Haematology 4, 635 (1975)

30. Cohen, S.G., Kostage, S.T., Rizzo, A.P.:
Experimental eosinophilia. IX. Effects of immunosuppressive agents on eosinophil cell responses.
J. Allergy 39, 129 (1967)
31. Cohen, S.G., Sapp, T.M., Gallia, A.:
Experimental eosinophilia. V. Specificity of regional lymph node responses to antigen-antibody systems.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 29 (1963)
32. Cohen, S.G., Sapp, T.M., Rizzo, A.P., Kostage, S.T.:
Experimental eosinophilia. VII. Lymph node responses to altered gamma globulins.
J. Allergy 35, 346 (1964)
33. Conroy, M.C., Orange, R.P., Lichtenstein, L.M.:
Release of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) from human leukocytes by calcium ionophore A 23187.
J. Immunol. 116, 1677 (1976)
34. Czarnetzki, B.M.:
Eosinophil chemotactic factor release from neutrophils by *Nippostrongylus brasiliensis* larvae.
Nature 271, 553 (1978)
35. Czarnetzki, B.M., König, W., Lichtenstein, L.M.:
Eosinophil chemotactic factor (ECF). I. Release from polymorphonuclear leukocytes by the calcium ionophore A 23187.
J. Immunol. 117, 229 (1976)
36. Czarnetzki, B.M., König, W., Lichtenstein, L.M.:
Antigen-induced eosinophil chemotactic factor (ECF) release by human leukocytes.
Inflammation 201, 215 (1976)
37. Czarnetzki, B.M., König, W., Lichtenstein, L.M.:
Eosinophil chemotactic factor (ECF). IV. Inhibitory activity in human peripheral leukocytes.
Int. Arch. Allergy App. Immunol. 56, 398 (1978)
38. De Chatelet, L.R., Migler, R.A., Shirley, P.S., Muss, H.B., Szejda, P., Bass, D.A.:
Comparison of intracellular bactericidal activities of human neutrophils and eosinophils.
Blood 52, 609 (1978)
39. de Duve, C.:
Tissue fractionation - past and present.
J. Cell. Biol. 50, 20D (1971)

40. de Duve, C., Berthet, J., Beaufay, H.:
Gradient centrifugation of cell particles: theory and applications.
Progress in Biophys. and Biochemical Chemistry 9, 325 (1959)
41. de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F.:
Tissue fractionation studies: 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue.
Biochem. J. 60, 604 (1955)
42. de Pierre, J.W., Karnovsky, M.L.:
Plasma membranes of mammalian cells.
J. Cell. Biol. 56, 275 (1973)
43. Dessaint, J.P., Capron, M., Bout, D., Capron, A.:
Quantitative determination of specific IgE antibodies to schistosome antigens and serum IgE levels in patients with schistosomiasis.
Clin. Exp. Immunol. 20, 427 (1975)
44. Diaz-Perez, J.L., Goldyne, M.E., Winkelmann, R.K.:
Prostaglandins and chemotaxis: Enhancement of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by prostaglandin F_{2α}
J. Invest. Dermatol. 66, 149 (1976)
45. Dingle, I.T.:
Lysosomes, a laboratory handbook.
North-Holland Publishing Company, 1972
46. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.:
Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
Anal. Chem. 28, 350 (1956)
47. Ehrlich, P.:
Über die spezifischen Granulationen des Blutes.
Archiv für Anatomie und Physiologie, Leipzig,
Physiol. Abstr. : 571 (1879)
48. Evans, W.H.:
Fractionation of liver plasma membranes prepared by zonal centrifugation.
Biochem. J. 166, 833 (1970)
49. Frickhofen, N., König, W.:
Der neutrophile Granulozyt: Kompartimentierung als Funktionsprinzip.
DMW 104, 1529 (1979)

50. Gallin, J.I., Quie, P.G. (Hrsg.):
Leukocyte chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical
Implications.
New York: Raven Press, 1978
51. Gleich, G.J., Loegering, D.A., Mann, K.G., Maldonado, J.E.:
Comparative properties of the Charcot-Leyden crystal protein
and the major basic protein from human eosinophils.
J. Clin. Invest. 57, 633 (1976)
52. Goetzl, J.:
Modulation of human eosinophil polymorphonuclear leukocyte
migration and function.
Amer. J. Pathol. 85, 419 (1976)
53. Goetzl, E.J., Austen, K.F.:
A neutrophil immobilizing factor derived from human leuko-
cytes. I. Generation and partial characterization.
J. Exp. Med. 136, 1564 (1972)
54. Goetzl, E.J., Austen, K.F.:
Active site chemotactic factors and the regulation of the human
neutrophil chemotactic response.
Antibiotics and Chemotherapy 19, 218 (1974)
55. Goetzl, E.J., Austen, K.F.:
Purification and synthesis of eosinophilotactic tetrapeptides
of human lung tissue: Identification as eosinophil chemotactic
factor of anaphylaxis.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72, 4123 (1975)
56. Goetzl, E.J., Austen, K.F.:
Structural determinants of the eosinophil chemotactic activity
of the acidic tetrapeptides of eosinophil chemotactic factor of
anaphylaxis.
J. Exp. Med. 144, 1424 (1976)
57. Goetzl, E.J., Gorman, R.R.:
Chemotactic and chemokinetic stimulation of human eosinophil
and neutrophil polymorphonuclear leukocytes by 12-L-hydroxy-
5,8,10-heptadecatrienoic acid (HHT).
J. Immunol. 120, 526 (1978)
58. Goetzl, E.J., Tashjian, A.H., Rubin, R.H., Austen, K.F.:
Production of a low molecular weight eosinophil polymorpho-
nuclear leukocyte chemotactic factor by anaplastic squamous
cell carcinomas of human lung.
J. Clin. Invest. 61, 770 (1978)

59. Goetzl, E.J., Wasserman, S.I., Austen, K.F.:
Eosinophil polymorphonuclear leukocyte function in
immediate hypersensitivity.
Arch. Pathol. 99, 1 (1975)
60. Goetzl, E.J., Woods, J.M., Gorman, R.R.:
Stimulation of human eosinophil and neutrophil polymorpho-
nuclear leukocyte chemotaxis and random migration by
12-L-hydroxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid.
J. Clin. Invest. 59, 179 (1977)
61. Goldstein, I.M.:
Polymorphonuclear leukocyte lysosomes and immune
tissue injury.
Prog. Allergy 20, 301 (1976)
62. Greene, B.M., Colley, D.G.:
Eosinophils and immune mechanisms: II. Partial characterization
of the lymphokine eosinophil stimulation promotor.
J. Immunol. 113, 910 (1974)
63. Harlan, J., De Chatelet, L.R., Iverson, D.B., McCall, C.E.:
Magnesium-dependent adenosine triphosphate as a marker
enzyme for the plasma membrane of human polymorphonuclear
leukocytes.
Infection and Immunity 15, 436 (1977)
64. Henson, P.M.:
The immunologic release of constituents from neutrophil
leukocytes. I. The role of antibody and complement on non-
phagocytosable surfaces or phagocytosable particles.
J. Immunol. 107, 1535 (1971)
65. Hirsch, J.G.:
Neutrophil leukocytes.
In: Zweifach, Grant, McClusky (Hrsg.) : The Inflammatory Process.
New York: Academic Press, 1974
66. Hirschhorn, R., Weissman, G.:
Isolation and properties of human leukocyte lysosomes in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119, 36 (1965)
67. Hoffstein, S., Soberman, R., Goldstein, I., Weissman, G.:
Concanavalin A induces microtubule assembly and specific
granule discharge in human polymorphonuclear leukocytes.
J. Cell. Biol. 68, 781 (1976)

68. Honsinger, R.W. jr., Silverstein, D., Arsdell, P.P. von, jr.:
The eosinophil and allergy: why?
J. Allergy Clin. Immunol. 49, 142 (1972)
69. Houck, J., Chang, C.:
The chemotactic properties of the products of collagenolysis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 69 (1971)
70. Hsu, S.Y.L., Hsu, H.F., Pefik, G.D., Lust, G.L., Osborne, J.W., Cheng, H.F.:
Mechanism of immunity to schistosomiasis: histopathologic study of lesions elicited on rhesus monkeys during immunizations and challenge with cercariae of *Schistosoma japonicum*.
J. Reticuloendoth. Soc. 18, 167 (1975)
71. Hubscher, T.:
Role of the eosinophil in the allergic reactions. I. EDI - an eosinophil derived inhibitor of histamine release.
J. Immunol. 119, 1379 (1975)
72. Hudson, G.:
Quantitative study on eosinophil granulocytes.
Semin. Haematol. 5, 166 (1968)
73. Huntley, C.C., Costas, M.C.:
Eosinophilia and gamma-globulinemia.
Pediatrics 36, 425 (1965)
74. Kaliner, M., Wasserman, S.I., Austen, K.F.:
Immunologic release of chemical mediators from human nasal polyps.
N. Engl. J. Med. 289, 277 (1973)
75. Kaplan, A.P., Goetzl, E.J., Austen, K.F.:
The fibrinolytic pathway of human plasma. II. The generation of chemotactic activity by activation of plasminogen proactivator.
J. Clin. Invest. 52, 2591 (1973)
76. Kaplan, A.P., Kay, A.B., Austen, K.F.:
A prealbumin activator of prekallikrein. III. Appearance of chemotactic activity for human neutrophils by the conversion of human prekallikrein to kallikrein.
J. Exp. Med. 135, 81 (1972)
77. Kater, L.A., Goetzl, J., Austen, K.F.:
Isolation of human phospholipase D.
J. Clin. Invest. 57, 1173 (1976)

78. Kay, A.B.:
Studies on eosinophil leukocyte migration. II. Factors specifically chemotactic for eosinophils and neutrophils generated from guinea-pig serum by antigen-antibody complexes.
Clin. Exp. Immunol. 7, 723 (1970)
79. Kay, A.B.:
Chemotaxis of eosinophil leukocytes in relation to immediate type hypersensitivity and the complement system.
In: *Chemotaxis: Its Biology and Biochemistry. Antibiotics and Chemotherapy*, 19, 271 (1974)
Basel: Karger
80. Kay, A.B.:
The eosinophil in infectious diseases.
Journal of Infectious Diseases 129, 606 (1974)
81. Kay, A.B.:
Functions of the eosinophil leukocyte.
Brit. J. Haematol. 33, 313 (1976)
82. Kay, A.B., Austen, K.F.:
The IgE-mediated release of an eosinophil leukocyte chemotactic factor from human lung.
J. Immunol. 107, 899 (1971)
83. Kay, A.B., Stechschulte, D.J., Austen, K.F.:
An eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis.
J. Exp. Med. 133, 602 (1971)
84. Keller, H.U., Hess, M.W., Cottier, H.:
The in vitro assessment of leukocyte chemotaxis.
Antibiotics and Chemotherapy 19, 112 (1974)
85. Keller, H.U., Wilkinson, P.C., Abercombie, M., Becker, E.L., Hirsch, J.G., Miller, M.E., Ramsey, W.S., Zigmond, S.H.:
A proposal for the definition of terms related to locomotion of leukocytes and other cells.
Clin. Exp. Immunol. 27, 377 (1977)
86. Kimball, H.R., Ford, G.H., Wolff, S.M.:
Lysosomal enzymes in normal and Chediak-Higashi blood leukocytes.
J. Lab. Clin. Med. 86, 616 (1975)
87. Klebanoff, S.J., Clark, R.A.:
The neutrophil: Function and clinical disorders.
Amsterdam, New York, Oxford: North Holland Publishing Company, (1978)

88. Klempner, M.S., Dinarello, C.A., Gallin, J.I.:
Human leukocytic pyrogen induces release of specific granule contents from human neutrophils.
J. Clin. Invest. 6, 1330 (1978)
89. Komiyama, A., Spicer, S.S.:
Microendocytosis in eosinophilic leukocytes.
J. Cell. Biol. 64, 622 (1975)
90. König, W.:
Struktur und Funktion des eosinophilen Leukozyten.
Immunität und Infektion 6, 97 (1978)
91. König, W., Czarnetzki, B.M.:
Inactivation of polymorphonuclear-neutrophil derived eosinophil chemotactic factor by human serum.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 57, 399 (1978)
92. König, W., Czarnetzki, B.M., Lichtenstein, L.M.:
Eosinophil chemotactic factor (ECF). II. Release during phagocytosis of human polymorphonuclear leukocytes.
J. Immunol. 117, 235 (1976)
93. König, W., Czarnetzki, B.M., Lichtenstein, L.M.:
Eosinophil chemotactic factor (ECF). III. Generation and release from human polymorphonuclear leukocytes.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 56, 364 (1978)
94. König, W., Ishizaka, K.:
Receptors for IgE. Binding of rat IgE with the subcellular components of normal rat mast cells.
Immunology 13, 345 (1976)
95. Lachmann, P.J., Kay, A.B., Thompson, R.A.:
The chemotactic activity for neutrophil and eosinophil leukocytes of the trimolecular complex of the fifth, sixth and seventh components of human complement (C 567) prepared in free solution by the "reactive lysis" procedure.
Immunology 19, 895 (1970)
96. Leffel, M.S., Spitznagel, J.K.:
Intracellular and extracellular degranulation of human polymorphonuclear azurophil and specific granules induced by immune complexes.
Infect. Immun. 10, 1241 (1974)

97. Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J.W., Fowler, S., de Duve, C.:
The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339.
J. Cell. Biol. 37, 482 (1968)
98. Lewis, R.A., Austen, K.F.:
Non respiratory functions of pulmonary cells: the mast cell.
Fed. Proc. 36, 2676 (1977)
99. Lewis, R.A., Goetzl, E.J., Wasserman, S.I., Valone, F.H., Rubin, R.H., Austen, K.F.:
The release of four mediators of immediate hypersensitivity from human leukemic basophils.
J. Immunol. 114, 87 (1975)
100. Litt, M.:
Studies in experimental eosinophilia. III. The induction of peritoneal eosinophilia by the passive transfer of serum antibody.
J. Immunol. 87, 522 (1961)
101. Litt, M.:
Studies in experimental eosinophilia. VII. Eosinophils in lymph nodes during the first 24 hours following primary antigenic stimulation.
J. Immunol. 98, 807 (1964)
102. Mackenzie, C.D., Ramalho-Pinto, F.J., McLaren, D.J., Smithers, S.R.:
Antibody-mediated adherence of rat eosinophils to schistosoma of *Schistosoma mansoni* in vitro.
Clin. Exp. Immunol. 30, 97 (1977)
103. Mahmoud, A.A.F., Stone, M.K., Kellermeyer, R.W.:
Eosinophilopoietin. A circulating low molecular weight peptide-like substance, which stimulates the production of eosinophils in mice.
J. Clin. Invest. 60, 675 (1977)
104. Mahmoud, A.A.F., Warren, K.S., Peters, P.A.:
A role for the eosinophil in acquired resistance to schistosoma mansoni infection as determined by anti eosinophil serum.
J. Exp. Med. 142, 805 (1975)
105. Mann, P.R.:
An electron-microscope study of the relations between mast cells and eosinophil leukocytes.
J. Pathol. 98, 183 (1969)

106. McLaren, D.J., Mackenzie, C.D., Ramalho-Pinto, F.J.:
Ultrastructural observations on the in vitro interaction
between rat eosinophils and some parasitic helminths.
Clin. Exp. Immunol. 30, 105 (1977)
107. Metschnikoff, E.:
Lectures on the comparative pathology of inflammation.
Dover, New York, 1968 (Original: 1892)
108. Müller, F., de Harven, E., Palade, G.E.:
The structure of eosinophil leukocyte granules in rodents and man.
J. Cell. Biol. 31, 349 (1966)
109. Olsson, I.:
Isolation of human leukocyte granules using colloidal silica-
polysaccharide density gradients.
Exp. cell Res. 54, 325 (1969)
110. Olsson, I., Venge, P., Spitznagel, J.K., Lehrer, R.I.:
Arginine-rich cationic proteins of human eosinophil granules.
Lab. Invest. 36, 493 (1977)
111. Parish, W.E., Luckhurst, E., Cowan, S.I.:
Eosinophilia: V. Delayed hypersensitivity, blood and bone marrow
eosinophilia, induced in normal guinea pigs by adoptive transfer
of lymphocytes from syngeneic donors.
Clin. Exp. Immunol. 29, 75 (1977)
112. Parmley, R.T., Spicer, S.S.:
Cytochemical and ultrastructural identification of a small type
granule in late human eosinophils.
Lab. Invest. 30, 557 (1974)
113. Phillips, S.M., Di Conza, J.J., Gold, J.A., Reid, W.A.:
Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse.
I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation
and host morbidity.
J. Immunol. 118, 594 (1977)
114. Ramsey, S., Grant, L.:
Chemotaxis.
In: *The Inflammatory Process*. Hrsg.: Zweifach, Grant, McClusky.
New York: Academic Press, 1974
115. Rest, R.F., Spitznagel, J.K.:
Subcellular distribution of superoxide dismutase in human
neutrophils.
Biochem. J. 166, 145 (1977)

116. Ruddy, S., Austen, K.F., Goetzl, E.J.:
Chemotactic activity derived from interaction of factor D and B
of the properdin pathway with cobra venom factor or C3b.
J. Clin. Invest. 55, 587 (1975)
117. Samter, M.:
The response of eosinophils in the guinea-pig to sensitization,
anaphylaxis and various drugs.
Blood 4, 217 (1949)
118. Schriber, R.A., Zucker-Franklin, D.:
Induction of blood eosinophilia by pulmonary embolization of
antigen-coated particles: The relationship to cell-mediated immunity.
J. Immunol. 114, 1348 (1975)
119. Schwartz, E.:
Die Lehre von der allgemeinen und örtlichen "Eosinophilia".
Ergebnisse Allg. Path. 17, 137 (1914)
120. Seeman, P.:
Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic
lysis and drug-induced lysis.
Fed. Proc. 33, 2116 (1974)
121. Segal, A.W., Peters, T.J.:
Analytical subcellular fractionation of human granulocytes with
special reference to the localization of enzymes involved in
microbicidal mechanisms.
Clin. Science and Mol. Med. 52, 429 (1977)
122. Sigma Technical Bulletin for Prod. No. L-6876.
St. Louis: Sigma, 1976
123. Solyom, A., Trams, E.G.:
Enzyme markers in characterization of isolated plasma membranes.
Enzyme 13, 329 (1972)
124. Spilberg, I., Mandell, B., Wochner, R.D.:
Studies on crystal-induced chemotactic factor. I. Requirement
for protein synthesis and neutral protease activity.
J. Lab. Clin. Med. 83, 56 (1974)
125. Spitznagel, J.K., Dalldorf, F.G., Leffel, M.S., Folds, J.D.,
Welsh, I.R.H., Cooney, M.H., Martin, L.E.:
Character of azurophil and specific granules purified from
human polymorphonuclear leukocytes.
Lab. Invest. 30, 774 (1974)

126. Stecher, V.J., Sorkin, E.:
The chemotactic activity of fibrin lysis products.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 43, 879 (1972)
127. Steele, R.H., Wilhelm, D.L.:
The inflammatory reaction in chemical injury.
III. Leukocytosis and other histological changes induced
by superficial injury.
Brit. J. Exp. Pathol. 51, 265 (1970)
128. Tesch, H.:
Medizinische Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität,
Mainz (1980)
129. Tesch, H., König, W., Frickhofen, N.:
Eosinophil chemotactic factor. Release from human poly-
morphonuclear neutrophils by arachidonic acid.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 58, 436 (1979)
130. Torisu, M., Yoshida, T., Ward, P.A., Chen, S.:
Lymphocyte derived eosinophil chemotactic factor. II. Studies
on the mechanism of activation of precursor substance by
immune complexes.
J. Immunol. 111, 1450 (1973)
131. Turnbull, L.W., Kay, A.B.:
Eosinophils and mediators of anaphylaxis. Histamine and
imidazole acetic acid as chemotactic agents for human
eosinophil leucocytes.
Immunology 31, 797 (1976)
132. Valone, F.H., Goetzl, E.J.:
Immunologic release in the rat peritoneal cavity of lipid
chemotactic and chemokinetic factors for polymorphonuclear
leukocytes.
J. Immunol. 120, 102 (1978)
133. Virchow, R.:
Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische
und pathologische Gewebelehre.
Berlin: Verlag von August Hirschfeld, 121 (1858)
134. Ward, P.A.:
A plasmin-split fragment of C'3 as a new chemotactic factor.
J. Exp. Med. 126, 189 (1967)

135. Ward, P.A.:
Chemotaxis of mononuclear cells.
J. Exp. Med. 128, 1201 (1968)
136. Ward, P.A.:
Chemotaxis of human eosinophils.
Am. J. Pathol. 54, 121 (1969)
137. Ward, P.A.:
Leukotaxis and leukotactic disorders.
Am. J. Pathol. 77, 520 (1974)
138. Ward, P.A., Hill, J.H.:
C5 chemotactic fragments produced by an enzyme in lysosomal granules of neutrophils.
J. Immunol. 104, 535 (1970)
139. Wasserman, S.I., Goetzl, E.J., Austen, K.F.:
Preformed eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A).
J. Immunol. 112, 351 (1974)
140. Wasserman, S.I., Goetzl, E.J., Austen, K.F.:
Inactivation of slow reacting substance of anaphylaxis by human eosinophil arylsulfatase.
J. Immunol. 114, 645 (1975)
141. Wasserman, S.I., Goetzl, E.J., Kaliner, M., Austen, K.F.:
Modulation of the immunological release of the eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis from human lung.
Immunology 26, 677 (1974)
142. Weaver, R.A., Boyle, W.:
Purification of plasma membranes of rat liver.
BBA 173, 377 (1969)
143. Weissmann, G., Zurier, R.B., Hoffstein, S.:
Leukocytic proteases and the immunologic release of lysosomal enzymes.
Am. J. Pathol. 68, 539 (1972)
144. White, J.G., Estensen, R.D.:
Selective labilization of specific granules in polymorphonuclear leukocytes by phorbol myristate acetate.
Am. J. Pathol. 75, 45 (1974)
145. Wilkinson, P.C.:
Chemotaxis and inflammation.
Edinburgh-London: Churchill Livingstone, 1974

146. West, B.C., Gelb, N.A., Rosenthal, A.S.:
Isolation and partial characterization of human eosinophil granules.
Am. J. Pathol. 81, 575 (1975)
147. West, B.C., Rosenthal, A.S., Gelb, N.A., Kimball, H.R.:
Separation and characterization of human neutrophil granules.
Am. J. Pathol. 77, 41 (1974)
148. Wright, D.G., Bralone, D.A., Gallin, J.I.:
The differential mobilization of human neutrophil granules.
Am. J. Pathol. 87, 273 (1977)
149. Wright, D.G., Gallin, J.I.:
The selective mobilization of specific granules by neutrophils
during adherence in vitro and during exudation in vivo.
Clin. Res. 24, 355 (1976)
150. Wright, D.G., Gallin, J.I.:
A functional differentiation of human neutrophil granules:
Generation of C5a by a specific (secondary) granule product and
inactivation of C5a by azurophil (primary) granule products.
J. Immunol. 119, 1068 (1977)
151. Wright, D.G., Malawista, S.E.:
The mobilization and extracellular release of granula enzymes from
human leukocyte during phagocytosis.
J. Cell. Biol. 53, 788 (1972)
152. Zeiger, R., Yurdin, D., Colten, H.:
Histamine metabolism: Cellular and subcellular localization of the
catabolic enzymes, histamine and histamine-methyl-transferase
in human leukocytes.
J. Allergy Clin. Immunol. 58, 172 (1976)
153. Zigmond, S.H., Hirsch, J.G.:
Leukocyte locomotion and chemotaxis.
J. Exp. Med. 137, 387 (1973)
154. Zolov, D.M., Levine, B.B.:
Correlation of blood eosinophilia with antibody classes.
Int. Arch. Allergy 35, 179 (1969)
155. Zucker-Franklin, D.:
Electron microscopic studies of human granulocytes: Structural
variations related to function.
Semin. Hematol. 5, 109 (1968)
156. Zucker-Franklin, D.
Eosinophil function and disorders.
Adv. Intern. Med. 19, 1 (1974)

LEBENS LAUF

Name : Norbert Frickhofen
Geburtsdatum : 14. 04. 1954
Geburtsort : Bonn
Eltern : Norbert Frickhofen, Facharzt für
Chirurgie (verst. am 16. 4. 1976)
Irmgard Frickhofen, geb. Koch
Eheschließung : 24. 5. 1977 in Wiesbaden mit
Monika Frickhofen, geb. Girschik,
Fachlehrerin

Schulbesuch :

1960 - 1964 Grundschule in Koblenz und Bassenheim
1964 - 1972 St. Josef-Gymnasium in Biesdorf/Eifel
18. 5. 1972 Abitur

Hochschulausbildung :

WS 1972/73 Immatrikulation zum Medizinstudium an der
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
März 1975 Ärztliche Vorprüfung
März 1976 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Mai 1976 - März 1978 Dissertation unter der Leitung von
Prof. Dr. W. König am Institut für
Medizinische Mikrobiologie, Mainz
(Direktor : Prof. Dr. P. Klein)
August 1978 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
November 1979 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

